UNIVERSITE DE LIMOGES

FACULTE DE SCIENCES ET TECHNIQUES

Ecole Doctorale Thématique 524
« Biologie-Sciences-Santé »

EA 3842 Homéostasie Cellulaire et Pathologies

EA 1069 Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

Année : 2010 N°……

THESE
Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline: Science de la vie et de la Santé

Présentée et soutenue publiquement par

Agnès SPARSA

Le 13 Juillet 2010

Synthèse de Porphyrines et Etudes cellulaires des effets biologiques en Photothérapie Dynamique

Thèse dirigée par les **Pr Marie-Odile Jauberteau** et **Pierre Krausz**

Soutenue devant le jury composé de :

Rapporteurs	**Françoise Heymans**, Professeur, Université Paris VII
	Alain Taïeb, Professeur, Université de Bordeaux
Examinateurs	**Michel D'Incan**, Professeur, Université de Clermont-Ferrand
	Jean-Marie Bonnetblanc, Professeur, Université de Limoges
	Pierre Krausz, Professeur, Université de Limoges
	Marie-Odile Jauberteau, Professeur, Université de Limoges
Invitée	**Marie-Hélène Ratinaud**, Professeur, Université de Limoges

Remerciements

Je remercie toutes les personnes qui m'ont soutenu dans cette longue… épreuve.

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, Madame le professeur Françoise Heymans, Monsieur le Professeur Alain Taïeb et Monsieur le Professeur Michel D'Incan qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail et d'en être rapporteurs et examinateurs. Je vous suis reconnaissante pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce manuscrit et pour les conseils et les suggestions qui m'ont été précieux. Je tiens à vous faire part ici de mon profond respect et de toute ma reconnaissance.

Je remercie le Professeur Pierre Krausz pour sa confiance en m'ayant offert l'opportunité de réaliser ce travail.

Marie-Odile, je te remercie pour m'avoir accueillie au sein de ton équipe de recherche quand j'étais à la « dérive » depuis des années… d'avoir accepté de co-diriger ce travail. Ton soutien permanent, ta disponibilité sans limite, ton optimisme inébranlable et tes conseils m'ont été d'une aide précieuse et m'ont permis de finaliser « enfin » ce travail de thèse.

Je remercie tout particulièrement monsieur le Professeur Jean-Marie Bonnetblanc, qui représente pour moi un « père » spirituel (je continue à « faire la fille » comme vous me l'avez souvent dit), un modèle d'honnêteté, de droiture, et de gentillesse qui a su me remettre sur « les rails » au bon moment. Vous avez été là pour moi à chaque instant pour m'apporter le soutien moral et scientifique ainsi qu'une « oreille attentive » dont j'avais besoin…ces derniers temps. Soyez assuré de mon profond respect et de toute ma reconnaissance.

Je remercie le Professeur Franck Sturtz de m'avoir permis de bénéficier de son savoir, de ses conseils scientifiques et de son expérience dans le domaine de la recherche. Soyez assuré de ma reconnaissance et mon profond respect.

Marie-Hélène RATINAUD et Mireille Verdier, je vous remercie toutes les deux de vos précieux conseils scientifiques et des nombreuses rencontres et discussions pour faire aboutir ce travail.

A toute l'équipe accueil 3842, pour l'aide pratique indispensable à la réalisation de ce travail dans une excellente ambiance de travail et la bonne humeur.

Je remercie aussi particulièrement Madame le Professeur Elisabeth Vidal pour son soutien permanent, pour croire en moi pendant les nombreux moments de « perditions » et de doute. Merci d'avoir été très tôt le matin ou très tard le soir présente et à l'écoute…

A Serge Boulinguez, C'est fait…pas « sans mal » comme on dit…mais c'est fait. Merci de tes précieux conseils scientifiques. Tu es un exemple pour moi et je suis fière d'avoir pu travailler à tes côtés pendant quelques années. J'y ai appris l'efficacité, la rigueur, la gentillesse et la générosité. Je te remercie d'avoir pris une part très active dans ma formation, de m'avoir toujours aidé, encouragé et conseillé dans des moments fréquents de doute et de révolte.

A Karine DURAND, tu as été là pour mes « premiers pas » dans ce travail et je te remercie de ton aide de « terrain », de ta bonne humeur toujours égale et de ton soutien.

A Madame Véronique Loustaud-Ratti, merci d'être toujours là pour m'écouter et m'aider…et m'avoir guidé depuis mes débuts.

A Hélène, Ghislaine, Aurélie, Jeanne, Dany, Yoanne pour les conseils précieux attrapés au « vol ».

A Vincent Sol, tu m'as permis de comprendre un peu mieux la chimie et je te remercie de ta disponibilité et ta gentillesse.

A **Itzia, Sorilla, et Emilie**, je vous remercie du soutien que vous m'avez apporté. Je reste infiniment sensible à vos encouragements et à l'ardeur de votre bienveillance. Je vous dois une reconnaissance particulière pour la générosité que vous m'avez témoigné et l'intérêt constant que vous avez porté à mon travail pendant vos années d'internat et encore aujourd'hui…

A Anne-Laure, des textos, des mails, des coups de fils, des invitations pas toujours honorées, (désolée) ton soutien donc et ton amitié m'ont permis de garder le « cap » pendant cette dernière année. Je t'en remercie infiniment.

A Valérie, je te remercie de m'avoir aidé à reprendre le dessus et finaliser ce travail. Cela a été possible grâce à ton dévouement vis-à-vis des patients me permettant d'être moins présente…au prix de sacrifices personnels et familiaux. Merci de ton amitié sans faille et de ton soutien moral quotidien et scientifique.

A Hélène, je te remercie de ton réconfort, de ton amitié, de ta gentillesse, des repas improvisés sympathiques et décontractants, des cinés et des Harry…

Tout le personnel du Service de Dermatologie du CHU de Limoges, pour sa gentillesse permanente à mon égard.

Mes derniers remerciements s'adressent à toute ma famille. Je remercie mes sœurs, Céline et Laëtitia, mes beaux-frères, Nicolas et Xavier et mon neveu Melvin pour me permettre de « m'échapper » de ce milieu pendant des moments privilégiés que nous savons partager. Je remercie mes parents pour leur soutien sans faille et les valeurs de la vie qu'ils ont su m'inculquer. Avec une pensée pour ceux qui nous ont quitté prématurément.

Sommaire

REMERCIEMENTS **1**
SOMMAIRE **3**
LISTE DES FIGURES **7**
LISTE DES TABLEAUX **10**
ABREVIATIONS **11**
INTRODUCTION GENERALE **14**
CHAPITRE I. ETAT DE LA QUESTION - OBJECTIF DU TRAVAIL **18**
I- LA PHOTOTHERAPIE DYNAMIQUE **18**
A- GENERALITES ET HISTORIQUE SUR LA PHOTOTHERAPIE DYNAMIQUE 18
B- LA PHOTOTHERAPIE DYNAMIQUE 19
1. Définition et types *19*
2. Principe et mécanismes d'action *22*
a) Principe *22*
b) Mécanismes d'action *23*
c) Mécanismes immunologiques et voies de signalisation *25*
3. Les Sources lumineuses *28*
4. Les photosensibilisants *33*
C- LA PHOTOTHERAPIE DYNAMIQUE EN CANCEROLOGIE 59
D-LA PHOTOTHERAPIE DYNAMIQUE SYSTEMIQUE EN ONCO-DERMATOLOGIE 61
E- LA PHOTOTHERAPIE DYNAMIQUE TOPIQUE EN ONCO-DERMATOLOGIE 63
II-LE MELANOME **65**
A- GENERALITES ET EPIDEMIOLOGIE 65
B- LES TRAITEMENTS CONVENTIONNELS DU MELANOME 66
C-. LES PERSPECTIVES D'AVENIR DANS LE TRAITEMENT DES MELANOMES METASTATIQUES 69
D- LE TRAITEMENT DES METASTASES CUTANEES DE MELANOME 71
E- L'UTILISATION DE LA PTD DANS LE TRAITEMENT DU MELANOME 72
1. Les études in vitro et chez l'animal *72*
2. Les études chez l'homme *74*
III-LES EFFETS BIOLOGIQUES DE LA LUMIERE VISIBLE **75**
A- LA PHOTOTHERAPIE NEONATALE, LE DEVELOPPEMENT DE NAEVUS ET LE RISQUE DE MELANOME 77
B- PHOTOTOXICITE DE LA LUMIERE BLEUE 78
C- LE ROLE DE LA LUMIERE BLEUE ET LE MELANOME CHOROÏDIEN 81
IV- BUT DU TRAVAIL **83**
CHAPITRE II. SYNTHESE DE MONO-TRIGLUCOSYLPORPHYRINES-RGD **84**
A-INTRODUCTION **84**
B-PRINCIPE ET SCHEMA GENERAL DE LA SYNTHESE **84**
C-DISCUSSION **87**
D-CARACTERISATION **91**

1. SPECTROSCOPIE UV VISIBLE 91
2. SPECTROMETRIE DE MASSE 92
3. SPECTROSCOPIE RMN 94

E-CONCLUSION 95

CHAPITRE III. EVALUATION BIOLOGIQUE DES TGP-RGD SUR DEUX LIGNEES CELLULAIRES 96

A-INTRODUCTION 96
1. LES PORPHYRINES A MOTIFS RGD 96
2. LA MORT CELLULAIRE 99
a) La nécrose 99
b) L'apoptose 100
3. LES EFFECTEURS MOLECULAIRES DE L'APOPTOSE 102
a) Les Caspases 102
b) Les membres de la famille Bcl-2 104
4. LES VOIES APOPTOTIQUES 106
a) La voie mitochondriale 106
b) La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort 108
5. OBJECTIF DU TRAVAIL 110

B-MATERIEL ET METHODES 111
1. LES LIGNEES CELLULAIRES 111
2. LA CULTURE CELLULAIRE ET LES COURBES DE CROISSANCE 111
a) Culture de cellules endothéliales capillaires bovines 111
b) Culture de lignées mélanocytaires tumorales murines (B16F10) 112
c) Les courbes de croissance des lignées 112
3. ETUDE DE CYTOTOXICITE ET PHOTOTOXICITE 112
4. LES PORPHYRINES DE SYNTHESE RGD 114
a) Solubilisation des porphyrines-RGD 114
b) Incubation des porphyrines 114
5. LES SOURCES LUMINEUSES 115
a) La lampe Waldmann PDT 450L 115
b) La Lampe PhotoDyn 501 Cosmedico 116
6. PROTOCOLE DE PHOTOTHERAPIE DYNAMIQUE EN LUMIERE BLEUE ET EN LUMIERE ROUGE 117
7. ETUDE COMPARATIVE AVEC LE PHOTOSENSIBILISANT DE REFERENCE : LE PHOTOFRIN® 118
8. ETUDE DE LA LOCALISATION DE LA PORPHYRINE DE SYNTHESE EN MICROSCOPIE DE FLUORESCENCE CONVENTIONNELLE ET CONFOCALE 118
10. ETUDE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN PAR LA METHODE DU DAPI 119
11. ETUDE DES PHENOMENES DE NECROSE PAR LA DETECTION DE PRODUCTION DE LDH 119

C-RESULTATS 121
1. DETERMINATION DE LA CONCENTRATION OPTIMALE DE CELLULES A ENSEMENCER PAR PUITS. 121
2. EVALUATION DE L'EFFICACITE IN VITRO DES PORPHYRINES A MOTIFS RGD EN LUMIERE ROUGE SUR DES MELANOCYTES TUMORAUX MURINS ET DES CELLULES ENDOTHELIALES 121
3. COMPARAISON DE L'EFFICACITE DES PORPHYRINES A MOTIFS RGD AVEC LE PHOTOFRIN® EN LUMIERE ROUGE 124
4. DETERMINATION DE LA CLAIRANCE D'ELIMINATION DE LA PORPHYRINE DE SYNTHESE A MOTIFS RGD 125
5. ETUDE DE LA LOCALISATION DE LA PORPHYRINE EN MICROSCOPIE CONFOCALE ET EN MICROSCOPIE A FLUORESCENCE 125
6. ETUDE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN APRES PTD 127
7. ETUDE DE LA PHOTOCYTOTOXICITE PAR DETECTION DE LA PRODUCTION DE LDH 128

8. EVALUATION DE L'EFFICACITE IN VITRO DES PORPHYRINES A MOTIFS RGD EN LUMIERE BLEUE SUR DES MELANOCYTES TUMORAUX MURINS ET DES CELLULES ENDOTHELIALES 128

D-DISCUSSION 130

E- CONCLUSION 134

CHAPITRE IV. PHOTOTOXICITE DE LA LUMIERE BLEUE 135

A-INTRODUCTION 135

1. LA LUMIERE BLEUE 135
2. LA PHOTOCYTOTOXICITE DE LA LUMIERE BLEUE SUR LES MELANOCYTES TUMORAUX 136
3. LES CRYPTOCHROMES, PHOTORECEPTEURS A LA LUMIERE BLEUE 137
4. PHOTOCYTOTOXICITE DE LA LUMIERE BLEUE SUR DES MELANOCYTES TUMORAUX MURINS ET SUR DES CELLULES ENDOTHELIALES. 139

B-MATERIEL ET METHODES 141

1. LES CELLULES B16F10 ET LES CELLULES ENDOTHELIALES EJG 141
2. LES SOURCES LUMINEUSES 141
3. LE PROTOCOLE D'ILLUMINATION 141
4. ETUDE DE CYTOTOXICITE ET DE PHOTOCYTOTOXICITE PAR LE TEST MTT 142
5. ETUDE DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE APRES ILLUMINATION EN LUMIERE BLEUE 142
6. ETUDE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN PAR LA METHODE DU DAPI APRES ILLUMINATION EN LUMIERE BLEUE 143
7. ETUDE DES PHENOMENES DE NECROSE PAR LA DETECTION DE PRODUCTION DE LDH 143
8. ANALYSE STATISTIQUE 144

C- RESULTATS 145

1. ETUDE DE LA PHOTOCYTOTOXICITE DE LA LUMIERE BLEUE ET ROUGE SUR DES LIGNEES DE MELANOCYTES TUMORAUX MURINS ET SUR LES CELLULES ENDOTHELIALES CAPILLAIRES BOVINES. 145
2. ETUDE DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE DES MELANOCYTES TUMORAUX MURINS B16F10 ILLUMINES EN LUMIERE BLEUE A 10 J/CM² ET 20 J/CM². 147
3. ETUDE DE LA VARIATION DE LA TEMPERATURE PENDANT L'ILLUMINATION 147
4. ETUDE DE LA FRAGMENTATION DE L'ADN PAR DAPI APRES L'ILLUMINATION EN LUMIERE BLEUE DES B16F10 148
5. ETUDE DE LA PHOTOCYTOTOXICITE PAR DETECTION DE LA PRODUCTION DE LDH APRES EXPOSITION A LA LUMIERE BLEUE DES B16F10 148
6. ETUDE IN VIVO DE L'EFFICACITE DE L'ILLUMINATION EN LUMIERE BLEUE DE METASTASES CUTANEES DE MELANOME. 148

D- DISCUSSION 151

E- CONCLUSION 154

CHAPITRE V. ETUDE DES PHENOMENES D'AUTOPHAGIE EN PHOTOTHERAPIE DYNAMIQUE 155

A-INTRODUCTION 155

1. L'AUTOPHAGIE 156
2. AUTOPHAGIE ET CANCER 160
3. L'AUTOPHAGIE ET LE MELANOME 161
4. L'AUTOPHAGIE EN PHOTOTHERAPIE DYNAMIQUE 162

B- MATERIEL ET METHODES 164

1. CULTURE CELLULAIRE ET SUIVI DE LA CROISSANCE 164
2. TRAITEMENT PHOTODYNAMIQUE 164

a) Incubation cellulaire du photosensibilisant *164*
b) Illumination en lumière rouge *165*
3. DETERMINATION DE LA PHOTOCYTOTOXICITE 166
4. MESURE DU POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL 166
5. ETUDE DE LA CONFORMATION DE LA CHROMATINE DES CELLULES B16F10 167
6. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE P53 ET DE BECLIN-1 PAR WESTERN BLOT 168
a) Extraction protéique *168*
b) Séparation des protéines par électrophorèse *168*
c) Transfert et révélation *169*
7. ETUDE DE LA PRESENCE DE LA GLYCOPROTEINE-P 169

***C*- RESULTATS 171**
1. CARACTERISTIQUES DE LA CROISSANCE ET MORPHOLOGIQUES DE LA LIGNEE B16F10 171
2. INDUCTION DE LA CYTOTOXICITE ET ETUDE DE L'EFFET POTENTIEL DU 5-ALA, COMBINE A L'ILLUMINATION EN LUMIERE ROUGE, SUR LA LIGNEE B16F10 171
3. MESURE DU POTENTIEL MEMBRANAIRE MITOCHONDRIAL 175
4. OBSERVATION DES NOYAUX DES CELLULES B16F10 177
5. ANALYSE DE L'EXPRESSION DE P53 PAR WESTERN BLOT 178
6. FACTEURS POUVANT EXPLIQUER L'INSENSIBILITE DE LA LIGNEE B16F10 A LA PDT 179
a) Conditions d'illumination *179*
b) Recherche d'une protéine d'efflux sur la lignée cellulaire B16F10 ..... *179*
c) Etude de l'effet potentiel protecteur de la mélanine *180*
7. ETUDE DE LA SIGNALISATION DE MORT SUR LA LIGNEE DE MELANOCYTES B16F10 ET B16G4F. 183

D- DISCUSSION 184

E- CONCLUSION 187

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 188

ANNEXES 190

PUBLICATIONS 193

COMMUNICATION ORALE 198

COMMUNICATION AFFICHEE 199

BIBLIOGRAPHIE 200

Liste des Figures

FIGURE 1- SCHEMA D'UN COMPLEXE PHOTOSENSIBILISATEUR-AGENTS DE VECTORISATION 15
FIGURE 2 - SPECTRE DE LA LUMIERE BLANCHE 16
FIGURE 3 LA PHOTOTHERAPIE DYNAMIQUE ET LE "PHOTODIAGNOSTIC" DYNAMIQUE 20
FIGURE 4 PTD PHOTODIAGNOSTIQUE AVEC VISUALISATION DE L'ACCUMULATION DE PROTOPORPHYRINE IX APRES ILLUMINATION EN LIMIERE DE WOOD D'UN CARCINOME BASOCELLULAIRE SUPERFICIEL 20
FIGURE 5 PRINCIPE DE LA PTD SYSTEMIQUE 21
FIGURE 6 PRINCIPE DE LA PTD TOPIQUE 22
FIGURE 7 MECANISME PHOTOCHIMIQUE DE LA PHOTOTHERAPIE DYNAMIQUE 23
FIGURE 8 - ACTIVATION DE NF-KAPPAB APRES PTD 26
FIGURE 9 - CASCADE DE SIGNAUX DE TRANSDUCTION ACTIVEE PAR LA PTD 27
FIGURE 10 - SPECTRE D'EMISSION DE LA LAMPE PHOTOCURE ™ 30
FIGURE 11 - LES DIFFERENTES LONGUEURS D'ONDE DES RAYONNEMENTS 31
FIGURE 12 - PROFONDEUR DE PENETRATION DE LA LUMIERE DANS LA PEAU EN FONCTION DE LA LONGUEUR D'ONDE 32
FIGURE 13 - SPECTRE D'EMISSION/EXCITATION DE LA PPIX ET SOURCE LUMINEUSE VIOLETTE 32
FIGURE 14 - EXEMPLE DE COMPOSES TETRAPYRROLIQUES: LA PORPHYRINE BASE LIBRE (A) ; PORPHYRINE METALLEE (B) ; CHLORINE (C) ; BACTERIOCHLORINE (D); ISOBACTERIOCHLORINE (E) 34
FIGURE 15- LES DIFFERENTES NOMENCLATURES : APPELLATION GENERALE (A) ; NOMENCLATURE DE FISCHER (B) ; NOMENCLATURE SYSTEMATIQUE (C) 35
FIGURE 16 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES ATROPOISOMERES DE MESO-ARYLPORPHYRINES. 35
FIGURE 17 - SPECTRE UV-VISIBLE CARACTERISTIQUE D'UNE PORPHYRINE BASE LIBRE DE TYPE MESO 36
FIGURE 18 - REACTION D'OBTENTION DE DERIVES D'HEMATOPORPHYRINE 37
FIGURE 19 - STRUCTURE DE LA PROTOPORPHYRINE IX ET DU 5 AAL 39
FIGURE 20 – SCHEMA DE LA BIOSYNTHESE DE L'HEME 40
FIGURE 21 - PROCEDURE D'APPLICATION DU LEVULAN® KERASTICK 42
FIGURE 22 - PROCEDURE DE TRAITEMENT DE PDT TOPIQUE AVEC LE METVIXIA® 44
FIGURE 23 - STRUCTURE DU TEXAPHYRINE DE LUTETIUM 45
FIGURE 24 - STRUCTURE DE LA M-THPP (PORPHYRINE) (A) ET LA M-THPC (CHLORINE) (B) 46
FIGURE 25- STRUCTURE DE LA VISUDYNE® 48
FIGURE 26 - STRUCTURE MOLECULAIRE DE L'ETIOPURPURINE D'ETAIN 49
FIGURE 27 - STRUCTURE DE LA MONO-L-ASPARTYLCHLORINE 50
FIGURE 28- STRUCTURE DE LA CHLOROALUMINIUM PHTHALOCYANINE SULPHONEE. 51
FIGURE 29- STRUTURE DE LA PORPHYCENE FERRIQUE 52
FIGURE 30- BACTERIOPHEROPHORBIDE PALLIDIUM 53
FIGURE 31 - STRUCTURE DU COMPLEXE PORPHRINE-ESTRADIOL 54
FIGURE 32 - STRUCTURE DU COMPLEXE PORPHYRINE-ACIDE FOLIQUE 54
FIGURE 33 - EXEMPLES D'ARYLPORPHYRINES CATIONIQUES *O*-GLYCOSYLEES ET NEUTRES *S*-GLYCOSYLEES 55
FIGURE 34- EXEMPLES DE MONOARYLPORPHYRINES MONOGLYCOSYLEES 56
FIGURE 35 - CHLORINE – B-GALACTOSE 56
FIGURE 36 - STRUCTURE DE DEUX CHLORINES TRIGLUCOSYLEES 57
FIGURE 37- STRUCTURE D'UNE CHLORINE ET UNE PORPHYRINE PORTANT UNE UNITE 2-AMINOGLUCOSAMINE ACETYLEE 57
FIGURE 38- STRUCTURE CHIMIQUE DE L'HYPERICIN 59
FIGURE 39 - MECANISME D'ACTIVATION UTILISANT LA FAD : PHOTOCYCLE DE LA FLAVINE 79
FIGURE 40 - EPOXIDATION DE L'A2E APRES ILLUMINATION 81
FIGURE 41-SCHEMA RETROSYNTHETIQUE DE LA PORPHYRINE 5A,B 85
FIGURE 42-STRUCTURE DES MESO TRIGLUCOSYLPORPHYRINES MONO RGD 5 A (EN POSITION PARA), B (EN POSITION ORTHO) .87
FIGURE 43- SYNTHESE DES MESOHYDROXYPHENYLTRIGLUCOSYLPORPHYRINE 1 A, B SELON LINDSEY 89
FIGURE 44- SYNTHESE DES MONOCARBOXYPHENYLTRIGLUCOSYLPORPHYRINES (A, EN POSITION PARA, B EN POSITION ORTHO) 90
FIGURE 45 - PEPTIDE RGD SUR LA RESINE DE WANG 91
FIGURE 46 - SPECTRE DE MASSE HAUTE RESOLUTION DU COMPOSE 5A. 93

FIGURE 47 - SPECTRE RMN ^{1}H DU COMPOSE 5A. 94
FIGURE 48 - STRUCTURE DE LA TRIGLUCOSYLPORPHYRINE-RGD 96
FIGURE 49- PORPHYRINE DE SYNTHESE TRIGLUCOSYLPORPHYRINES RGD PARA OU ORTHO. 97
FIGURE 50 - STRUCTURE D'UNE INTEGRINE 98
FIGURE 51 - REPRESENTATION SCHEMATIQUE DES MODIFICATIONS MORPHOLOGIQUES CELLULAIRES AU COURS DE L'APOPTOSE ET DE LA NECROSE. 100
FIGURE 52 - SCHEMA D'ACTIVATION DES CASPASES 102
FIGURE 53 - LES DIFFERENTES CLASSES DE CASPASES HUMAINES 103
FIGURE 54 - LA VOIE MITOCHONDRIALE DE L'APOPTOSE 104
FIGURE 55 - PRINCIPALES PROTEINES DE LA FAMILLE BCL-2 105
FIGURE 56 - RELARGAGE DES SIMP AU COURS DE LA VOIE INTRINSEQUE DE L'APOPTOSE 107
FIGURE 57- LA VOIE DES RECEPTEURS DE MORT 109
FIGURE 58- SCHEMA SYNTHETIQUE DES DIFFERENTES VOIES DE SIGNALISATION 110
FIGURE 59 - PHOTOTHERAPIE DYNAMIQUE PDT 450L 115
FIGURE 60 - SPECTRE D'EMISSION DE LA LAMPE WALDMANN™ PDT 450L 116
FIGURE 61 - LA LAMPE PHOTODYN 501, COSMEDICO 116
FIGURE 62 - SEANCE D'ILLUMINATION EN LUMIERE BLEUE DES PLAQUES DE 96 PUITS CONTENANT DES B16F10 117
FIGURE 63 - SEANCE D'ILLUMINATION EN LUMIERE BLEUE DES PLAQUES DE 96 PUITS CONTENANT DES B16F10 117
FIGURE 64 - STRUCTURE DU DAPI ET PRINCIPE DU MARQUAGE DE L'ADN 119
FIGURE 65 - COURBE DE CROISSANCE DES LIGNEES EJG ET B16F10 121
FIGURE 66 - ETUDE DE LA CYTOTOXICITE ET PHOTOTOXICITE DE LA TRIGLUCOSYLPORPHYRINE-RGDO SUR LES B16F10 122
FIGURE 67 - COURBES DE CYTOTOXICITE ET PHOTOTOXICITE A DES CONCENTRATIONS VARIABLE DE LA PORPHYRINE SUR LES B16F10. 122
FIGURE 68 - ETUDE DE LA CYTOTOXICITE ET PHOTOTOXICITE DE LA TG-RGDP SUR LES B16F10 123
FIGURE 69 - COURBES DE CYTO ET PHOTOTOXICITE DE CONCENTRATION VARIABLE DE TG-RGDP SUR LES B16F10 123
FIGURE 70- ETUDE DE LA CYTOTOXICITE ET DE LA PHOTOTOXICITE DE LA TG-RGDP SUR LES EJG 124
FIGURE 71 - ETUDE COMPARATIVE DE L'EFFICACITE DU PHOTOFRIN® ET DE LA TG-RGDO SUR LES B16F10 124
FIGURE 72 - INEFFICACITE DE L'ILLUMINATION APRES 24HD'INCUBATION. 125
FIGURE 73- IMAGE DE MICROSCOPIE CONFOCALE, VISUALISATION DE L'AUTOFLUORESCENCE DE LA PORPHYRINE 126
FIGURE 74 - IMAGE DE MICROSCOPIE A FLUORESCENCE : VISUALISATION DE LA FLUORESCENCE DIFFUSE ET CYTOPLASMIQUE A 3H D'INCUBATION DE LA PORPHYRINE DE SYNTHESE 127
FIGURE 75 - IMAGE DE DAPI 128
FIGURE 76- ETUDE DE LA CYTOTOXICITE ET PHOTOCYTOXICITE DE LA TG-RGDP SUR LES EJG ET L'ACTION DE LA LUMIERE BLEUE 129
FIGURE 77- ETUDE DE LA PHOTOTOXICITE DE LA LUMIERE BLEUE SUR LES CELLULES MELANOCYTAIRES TUMORALES MURINES B16F10 129
FIGURE 78- PHOTOTOXICITE DE LA LUMIERE BLEUE ET ROUGE SUR LES B16F10 129
FIGURE 79- PHOTOTOXICITE DE LA LUMIERE ROUGE ET BLEUE SUR LES CELLULES EJG 129
FIGURE 80- STRUCTURE DE L'ŒIL 139
FIGURE 81 - ETUDE DE LA PHOTOCYTOTOXICITE DE LA LUMIERE VISIBLE (LUMIERE ROUGE VERSUS LUMIERE BLEUE VERSUS OBSCURITE) SUR LES MELANOCYTES TUMORAUX MURINS B16F10 145
FIGURE 82 - ETUDE DE LA PHOTOCYTOTOXICITE DE LA LUMIERE VISIBLE (LUMIERE BLEUE VERSUS LUMIERE ROUGE VERSUS OBSCURITE) SUR LES CELLULES ENDOTHELIALES CAPILLAIRES BOVINES EJG 145
FIGURE 83- POURCENTAGE DE CELLULES VIVANTES APRES L'EXPOSITION A 50J/CM^2 EN LUMIERE ROUGE ET 20J/CM^2 EN LUMIERE BLEUE. 146
FIGURE 84 - ETUDE DE LA PEROXYDATION LIPIDIQUE DES B16F10 ILLUMINEE PAR DE LA LUMIERE BLEUE 147
FIGURE 85 - METASTASES CUTANEES DE MELANOME ULCEREES ET HEMORRAGIQUES DE L'AVANT-BRAS DROIT AVANT ILLUMINATION EN LUMIERE BLEUE A 20 J/CM^2 149
FIGURE 86 - ASPECT CLINIQUE DES METASTASES CUTANEES DE MELANOME, MOINS HEMORRAGIQUES ET BLANCHATRE EN SURFACE APRES 5 JOURS CONSECUTIFS D'EXPOSITION A LA LUMIERE BLEUE A 20 J/CM^2 149
FIGURE 87- LES DIFFERENTS TYPES D'AUTOPHAGIE (MODIFIE A PARTIR DE WWW.ONCOENDO.COM) 157
FIGURE 88 - PROCESSUS D'AUTOPHAGIE 158
FIGURE 89 - REGULATION DE L'AUTOPHAGIE PAR DES SUPPRESSEURS DE TUMEURS ET DES ONCOGENES 159
FIGURE 90 - MECANISMES D'ACTION DU ACIDE POLYINOSINE-POLYCYTIDYLIQUE PIC AU COURS DU MELANOME 162
FIGURE 91 - LAMPE ROUGE AKTILITE®, MODELE CL128, GALDERMA 165

FIGURE 92 - RESUME DES ETAPES DU TRAITEMENT DE PHOTOTHERAPIE DYNAMIQUE APPLIQUE AUX CELLULES, A LA MISE EN PLACE DES DIFFERENTS TESTS ET ANALYSES EFFECTUEES. 165
FIGURE 93- COURBE DE CROISSANCE DES CELLULES B16F10 EN FLASQUE 171
FIGURE 94 - OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES DES CELLULES B16F10 NON TRAITEES, ET TRAITEES AU 5-ALA (3 MM) ET ILLUMINEES EN LUMIERE ROUGE (X 40). 172
FIGURE 95 - ETUDE DE LA PHOTOCYTOTOXICITE EN XTT SUR LA LIGNEE DES MELANOCYTES B16F10 DES CONDITIONS TEMOINS : 5-ALA (5 MM) SEUL ET ILLUMINATION EN LUMIERE ROUGE SEULE. 173
FIGURE 96 - ETUDE DE LA PHOTOCYTOTOXICITE EN XTT SUR LA LIGNEE DES MELANOCYTES B16F10 : 5-ALA (3 MM ET 5 MM) COMBINE A L'ILLUMINATION EN LUMIERE ROUGE. 174
FIGURE 97 - CYTOGRAMME DU DOUBLE MARQUAGE JC-1/TOPRO-3, REPRESENTANT LES TROIS POPULATIONS CELLULAIRES OBTENUES, SUR LES CELLULES B16F10 NON TRAITEES. LES MOYENNES DE QUATRE TESTS INDEPENDANTS ETAIENT REPRESENTEES, LES BARRES D'ERREURS NE POUVANT FIGURER DANS LA REPRESENTATION CHOISIE 176
FIGURE 98 - REPARTITION DES CELLULES INTACTES, EN APOPTOSE ET EN NECROSE DANS DES CULTURES DE MELANOCYTES B16F10 TEMOINS (NON TRAITES), TRAITEES AU 5-ALA (3 MM (A) ET 5 MM (B)) ET ANALYSEES AUX TEMPS POST-ILLUMINATION 0 H, 12 H,18 H, 24 H ET 48 H. 177
FIGURE 99 - MARQUAGE AU HOECHST 33342 DES CELLULES B16F10 TEMOINS (A) ET TRAITEES (3 MM) A 24H (B). 178
FIGURE 100 - WESTERN BLOT : DETECTION DE LA P53 ET DE L'ACTINE. 178
FIGURE 101 - ANALYSE EN IMMUNOFLUORESCENCE ET CONTRASTE DE PHASE DES CELLULES B16F10 : RECHERCHE DE L'EXPRESSION DE LA GLYCOPROTEINE-P PAR IMMUNOFLUORESCENCE INDIRECTE. 180
FIGURE 102 - ETUDE DE LA PHOTOCYTOTOXICITE EN XTT DES CONDITIONS TEMOINS SUR LA LIGNEE DES MELANOCYTES B16G4F : 5-ALA (5 MM) SEUL ET ILLUMINATION EN LUMIERE ROUGE SEULE. 181
FIGURE 103 - ETUDE DE LA PHOTOCYTOTOXICITE EN XTT SUR LA LIGNEE DES MELANOCYTES B16G4 : 5-ALA (3 MM ET 5 MM) COMBINE A L'ILLUMINATION EN LUMIERE ROUGE. 182
FIGURE 104 - OBSERVATIONS MICROSCOPIQUES (X 40) DES CELLULES B16G4F NON TRAITEES, ET TRAITEES AU 5-ALA (3 ET 5 MM) ILLUMINEES EN LUMIERE ROUGE A 24 H. 183
FIGURE 105 - EXPRESSION DE BECLIN-1 DANS LES DEUX LIGNEES APRES PDT EN WB 183

Liste des Tableaux

TABLEAU 1- CLASSIFICATION P TNM DE L'AJCC 6EME EDITION 67
TABLEAU 2- DETERMINATION DES MARGES D'EXERESE EN FONCTION DE L'INDICE DE BRESLOW 67
TABLEAU 3 : SPECTRE UV-VISIBLE DES PORPHYRINES 1A,B. 91
TABLEAU 4 : SPECTROMETRIE DE MASSE MALDI. 92
TABLEAU 5 : SPECTROMETRIE DE MASSE HAUTE RESOLUTION. 93
TABLEAU 6 - SOLUTIONS POUR LA PREPARATION DES GELS DE SEPARATION ET DE CONCENTRATION POUR UN GEL D'ELECTROPHORESE SDS-POLYACRYLAMIDE TRIS-GLYCINE. 190
TABLEAU 7 : COMPOSITION DES DIFFERENTS TAMPONS UTILISES POUR LE WESTERN BLOT. 191
TABLEAU 8 : ANTICORPS PRIMAIRES ET SECONDAIRES UTILISES EN WB. 192

Abréviations

AAL : **A**cide 5-**A**mino**L**évulinique

AJCC : **A**merican **J**oint **C**ommitee on **C**ancer

AlClPc : **P**hthalo**c**yanine d'**al**uminium chlorhée

AIF : **A**poptosis **I**nducing **F**actor

AMM : **A**utorisation de **M**ise sur le **M**arché

ANT : **A**denine **N**ucleotide **T**ranslocase

AP-1 : **A**ctivator **P**rotein 1

Apaf-1 : **A**poptotic **p**rotease **a**ctivating **f**actor **1**

APS : **A**denosine 5'**P**hospho**S**ulfate

Arg (R) : **Arg**inine

ARNm : **A**cide **R**i**N**ucléique **m**essager

ASIP : **A**gouti **SI**gnaling **P**eptide

Asn (D) : **Asp**aragine

ATCC : **A**merican **T**ype **C**ell **C**ulture

ATG : **A**u**T**opha**G**y related gene

ATMPn : 9-**A**cétoxy-2, 7, 12, 17-**T**etrakis-(beta-**M**ethoxyethyl)-**P**orphycè**n**e

ATP : **A**dénosine **T**ri**P**hosphate

Bak (ou Baq) : **B**cl-2 homologous **A**ntagonist **K**iller

Bax : **B**cl-2 **A**ssociated **X**

Bcl-2 : **B**-**c**ell **l**eukemia/lymphoma-**2**

BET : **B**romure d'**ET**hidium

BH : **B**cl-2 **H**omology

Bif-1 : Endophilin B1

BPD-MA : **B**enzo**P**orphyrin **D**erivative **M**onoacid ring **A**

BSA : **B**ovine **S**erum **A**lbumine

CARD : **CA**spase **R**ecruitement **D**omain

CASPASE : **C**ysteine-containing **ASP**artate-specific prot**ASE**

CBC : **C**arcinome **B**aso**C**ellulaire

CBCn : **C**arcinome **B**aso**C**ellulaire **n**odulaire

CBCs : **C**arcinome **B**aso**C**ellulaire **s**uperficiel

CDKN2A : **C**yclin-**D**ependent **K**i**N**ase inhibitor **2A**

CDK4 : **C**yclin-**D**ependent **K**i**N**ase 4

cFLIP : **c**ellular **F**LICE-**L**ike **I**nhibitory **P**rotein

ClAlPcS : **Cl**oro**Al**uminium **P**hthalo**c**yanine **S**ulfonée

CMH : **C**omplexe **M**ajeur d'**H**istocompatibilité

CSC : **C**arcinome épidermoïde

CTLA4 : **C**ytotoxic **T** **L**ymphocytes associated **A**ntigen **4**

$\Delta\psi_{mt}$: différence de potentiel transmembranaire mitochondrial

DD : **D**eath **D**omain

DED : **D**eath **E**ffector **D**omain

DHE : **Di**-**H**ematoporphyrine **E**ther ou ester

DISC : **D**eath-**I**nducing **S**ignaling **C**omplex

DMEM : **D**ulbecco's **M**odified **E**agles's **M**edium

DMLA : **D**égénérescence **M**aculaire **L**iée à l'**Â**ge

DMSO : **Di**-**M**ethyl**S**ulf**O**xide

DO : **D**ensité **O**ptique

EDTA : **A**cide éthylène**D**iamine **T**étra**A**cétique

EGF : **E**pidermal **G**rowth **F**actor

ELISA : **E**nzyme **L**inked **I**mmuno**s**orbent **A**ssay

ERK : **E**xtracellular signal-**R**egulated **K**inase

ERO : **E**spèces **R**éactives de l'**O**xygène

Fas : **a**poptosis **s**timulating **F**ragment, TNF superfamily receptor 6

FAD : **F**lavin **A**denosine **D**inucleotide

FADD : **F**as **A**ssociated **D**eath **D**omain

FDA : **F**ood and **D**rug **A**dministration

FITC : fluoresceine Isothiocyannate

Gly (G) : **G**lycine

HDL : **H**igh **D**ensity **L**ipoprotein

HIF-1 : **H**ypoxia-**I**nducible **F**actor-1

Hp : **H**émato**p**orphyrine

HpD : **H**émato**p**orphyrine **D**érivée

HPLC : **H**igh **P**erformance **L**iquid **C**hromatography

HvD : **Hy**droxyéthylvinyl **D**eutéroporphyrine

IAP : **I**nhibiting **A**poptosis **P**rotein

ICAM : **I**nter **C**ellular **A**dhesion **M**olecule

IFI : **I**mmuno**F**luorescence **I**ndirecte

Ig : **I**mmuno**g**lobuline

IL : **I**nter**l**eukine

IR : **I**nfra-**R**ouge

IV : **I**ntra-**V**eineux

KA : **K**ératose **A**ctinique

kDa : **k**ilo**Da**lton

LCSN : **L**aboratoire de **C**himie et des **S**ubstances **N**aturelles

LDL : **L**ow **D**ensity **L**ipoproteins

LED : **L**ight **E**mitting **D**iode

MAL : **M**éthyl-**A**mino**L**évulinate

MAPK : **M**itogen **A**ctivated **P**roteins **K**inase

MB : **M**aladie de **B**owen

MC1R : **M**elano**C**ortin **1** **R**eceptor

MDA-5: **M**elanoma-**D**ifferentiation-**A**ssociated gene 5

MDR-1 : **M**ulti**D**rug **R**esistance 1

MEM : **M**inimum **E**ssential **M**edium

MP : **M**embrane **P**lasmique

MRP : **M**ulti-**R**esistant-**P**rotein

m-THPC : ***m****eso*-**T**etra**H**ydroxy**P**henyl**C**hlorine

m-THPP : ***m****eso*-**T**etra**H**ydroxy**P**henyl**P**orphyrine

m-TPP : ***m****eso*-**T**etra**P**henyl**P**orphyrine

MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium

NF-κB : **N**ecrosis **F**actor-**κ B**

Npe6 : **N**-aspartylchlorine e6

$^1O_2^-$: **O**xygène singulet

PBS : **P**hosphate **B**uffered **S**aline

PCR : **P**olymerase **C**hain **R**eaction

PDD : **P**hoto**D**iagnostic **D**ynamique

PE : **P**hosphatidyl **E**thanolamine

PEG : **P**oly**E**thylène**G**lycol

PEI : **P**oly**E**thylène**I**mine

PFA : **P**ara**F**orm**A**ldehyde

P-gp 170: **g**lyco**p**rotéine **P-170**

PI3K : **P**hosphatidyl **I**nositol **3**-phosphate **K**inase

pIC : acide **P**oly**I**nosine-poly**C**ytidylique

PMSF : **P**henyl**M**ethane**S**ulfonyl**F**luoride

Pp : **P**roto**p**orphyrine

PpIX : **P**roto**p**orphyrine **IX**

PS : **P**hoto**S**ensibilisant

PSA : **P**rostate **S**pecific **A**ntigen

PTD : **P**hoto**T**hérapie **D**ynamique

PTPC : **P**ermeability **T**ransition **P**ore **C**omplex

RC : **R**émission **C**omplète

RE : **R**éticulum **E**ndoplasmique

RIP1 : **R**eceptor **I**nteracting **P**rotein

RITC : Isothiocyanate de rhodamine

RGD : Arginine-Glycine-Acide aspartique

SDS : **S**odium **D**odecyl **S**ulfate

Smac/DIABLO : **S**econd-**m**itochondrial-derived **a**ctivator of **c**aspase/**D**irect **I**A**P** **B**inding Protein with **LO**w PI

SIMP : **S**oluble **I**ntermembrane **M**itochondrial **P**roteins

SVF : **S**érum de **V**eau **F**œtal

TEMED : **T**etra**M**ethyl**E**thylene**D**iamine

TG-RGDo : **T**ri**G**lucosylprophyrine-**RGD o**rtho

TG-RGDp : **T**ri**G**lucosylprophyrine-**RGD p**ara

TIL : **T**umour **I**nfiltrating **L**ymphocytes

TNF : **T**umor **N**ecrosis **F**actor

TNFR : **T**umor **N**ecrosis **F**actor **R**eceptor

TR : **T**aux de **R**éponse

TRADD : **T**NF **R**eceptor-1 **A**ssociated **D**eath **D**omain

TRAF : **T**NF-**R**elated **A**ssociated **D**eath **D**omain

TRAIL : **T**NF-**R**elated **A**poptosis **I**nducing **L**igand

TRC : **T**aux de **R**éponse **C**omplète

TRP : **T**aux de **R**éponse **P**artielle

Uma : unité de masse atomique

UV : **U**ltra**V**iolet

VCAM : **V**ascular **C**ell **A**dhesion **M**olecule

VDAC : **V**oltage **D**ependent **A**nion **C**hannel

VEGF : **V**ascular **E**ndothelial **G**rowth **F**actor

WB : **W**estern **B**lot

XTT : 2,3-bis (2-Méthoxy-4 nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

……

Introduction générale

La photothérapie dynamique (PTD) est une modalité thérapeutique déjà ancienne des cancers généraux et cutanés qui a connu un essor tout particulier ces 15 dernières années[1-3]. Le principe est fondé sur la fixation d'agents photosensibilisants, tels que des porphyrines ou des chlorines sur le tissu tumoral. Leur activation est due à l'illumination par de la lumière visible d'une longueur d'onde appropriée. Ceci a pour conséquence la destruction sélective des tissus par un mécanisme d'oxydation irréversible. L'illumination est de faible intensité sans effet thermique majeur et permet l'activation du photosensibilisant et la production de composés toxiques.
La PTD est un type de thérapie anti-cancéreuse dans laquelle la photosensibilisation se focalise sélectivement dans des tissus tumoraux et provoque un effet phototoxique avec la formation d'oxygène singulet, d'espèces réactives de l'oxygène et une nécrose ou une apoptose tumorale après irradiation[4].

En dermatologie, cette technique a surtout été développée pour le traitement des carcinomes cutanés avec actuellement l'utilisation de précurseurs biochimiques des porphyrines comme l'acide δ-amino-lévulinique (AAL) appliqué localement [5]. Très récemment ont été mises sur le marché des substances spécifiquement destinées à cette application (Levulan® Kerastick, Metvix®, Metvixia®…) pour le traitement des kératoses actiniques, de la maladie de Bowen, et de certaines formes de carcinomes basocellulaires. La PTD avec l'AAL topique apparaîtrait d'efficacité, dans certaines études, supérieure ou égale aux traitements de référence avec peu d'effets secondaires et de bons résultats cosmétiques [6].

Les photosensibilisants les plus utilisés aujourd'hui en dermatologie, sont soient des porphyrines endogènes (protoporphyrine IX dont l'accumulation cellulaire est obtenue par l'application préalable d'un précurseur l'AAL) soient de porphyrines exogènes ou de dérivés de porphyrines (benzoporphyrines, hématoporphyrines, chlorines, phthalocyanines…). Les premiers agents photosensibilisants étaient des dérivés de l'hématoporphyrine, mélange hétérogène de porphyrines obtenu à partir de sang de vache. Les agents photo-actifs des dérivés de l'hématoporphyrine ont été partiellement purifiés et commercialisés sous le nom de Photofrin II®

(porfimer de sodium), sous forme injectable[7]. Le Photofrin II® est un mélange complexe de porphyrines comprenant des précurseurs de dimères et de trimères reliés par des liaisons éther ou ester, dont certaines sont non encore identifiées. Son utilisation depuis quelques années laisse entrevoir un certain nombre d'inconvénients: peu de sélectivité en concentration entre tissus sains et néoplasiques, faible coefficient d'absorption dans le rouge imposant l'utilisation de fortes doses, accumulation dans la peau avec une faible clairance alors responsable d'une photosensibilité rémanente jusqu'à 8 semaines après le traitement. Des photosensibilisants de seconde génération, chlorine et benzoporphyrin Verteporfrin®, plus pures, plus phototoxiques, mais très hydrophobes ont été développés. Leur faible hydrosolubilité nécessite l'utilisation de forme galénique particulière, liposomée comme le Verteporfrin®, qui le protège également des mécanismes de dégradation enzymatique. Elles peuvent être administrées par voie intra-veineuse avec une élimination hépatique rapide en moins de 24h, limitant ainsi la durée des risques de photosensibilisation cutanée au bout de quelques jours.

Il apparaît de plus en plus intéressant de réaliser un adressage spécifique de principes actifs à potentialité anticancéreuse, vers les cellules malignes grâce à des agents de ciblage selon la stratégie représenté ci-dessous[8].

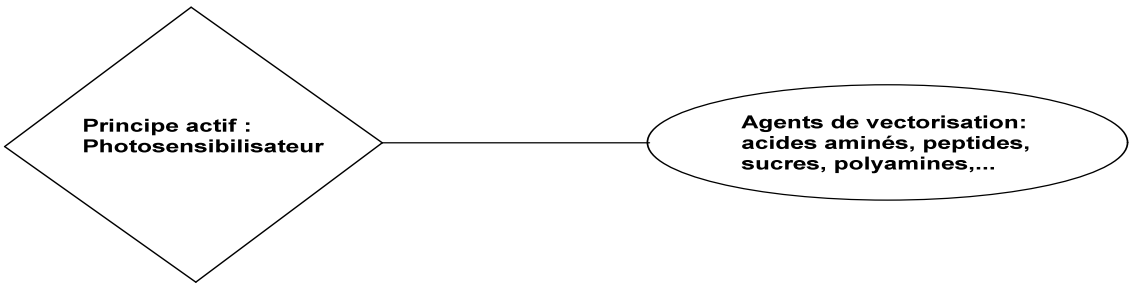


Figure 1- Schéma d'un complexe photosensibilisateur-agents de vectorisation [8]

L'utilisation de la PTD dans le traitement du mélanome est controversée. Le Photofrin II® est inefficace sur le mélanome pigmenté car il existe une très faible pénétration de la lumière de longueur d'onde à 630 nm dans les tissus riches en mélanine[9].

Le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de l'Université de Limoges, a conçu un grand nombre de porphyrines glycosylées ayant la propriété de se fixer préférentiellement sur les lectines membranaires. La richesse attestée de certaines cellules cancéreuses en lectine a justifié cette orientation. Plus récemment, le laboratoire a synthétisé deux nouvelles variétés de porphyrines, porphyrine-polyamine et porphyrine-RGD, dont l'étude permettra d'évaluer leur capacité à se fixer préférentiellement et spécifiquement dans les tissus tumoraux mélaniques.

Ces deux variétés de photosensibilisateurs ont montré une activité photodynamique plus importante que le Photofrin II® sur la lignée promyélocytaire K562[7,10].

Une variété a particulièrement attiré notre attention : les porphyrines-RGD. Le mélanome, comme d'autres tumeurs malignes, provoque la formation d'une vascularisation faite de néo-vaisseaux tumoraux permettant le développement de la tumeur. Les thérapeutiques utilisées pour le traitement du mélanome métastatique sont aujourd'hui très décevantes. Le traitement des tumeurs par destruction de la néovascularisation semble être une approche intéressante. Notre étude devrait permettre d'étudier pour la première fois ces porphyrines *in vitro* sur des mélanocytes murins tumoraux.

Le choix de la source est conditionné par les longueurs d'onde absorbées par la porphyrine. Les porphyrines-RGD, qui ont été utilisées pendant l'étude, absorbent dans des longueurs d'onde de 417-420 nm (Fig-2).

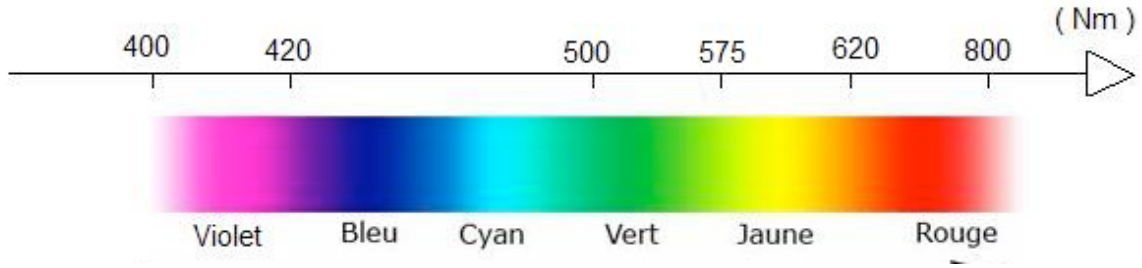


Figure 2 - Spectre de la lumière blanche

Leur absorbance dans cette zone du spectre est suffisante pour activer un état triplet et obtenir un effet photodynamique pour des fluences relativement basses, proche de 10 J/cm^2, réduisant l'effet thermique. En revanche, sa pénétration est plus restreinte et se limite au derme superficiel chez l'homme. La destruction de la porphyrine en quelques secondes après l'illumination en

lumière bleue nous a conduit à utiliser la lumière rouge. Les sources émettant une lumière rouge sont les plus utilisées car la bande 600-730 nm correspond à la fenêtre optique de la peau permettant une pénétration jusqu'à 1 cm de profondeur. Elles nécessitent une plus grande énergie jusqu'à 75 mW/cm^2. Les lampes à haute pression (Cure light™ de Photocure, Cosmedico™ ou Aktilite™ de Galderma) émettent une certaine quantité d'infrarouge, malgré la mise en place de filtre dichroïque, provoquant un échauffement cutané, entraînant des sensations de brûlure.

Les trois sources lumineuses disponibles, dans le service de dermatologie du CHU de Limoges, ont été utilisées pour réaliser les tests de photocytotoxicité *in vitro* sur deux lignées. Elles ont permis de démontrer que les lignées cellulaires ne répondent pas de manière similaire à la lumière rouge et la lumière bleue. La compréhension des mécanismes a été abordée.

Chapitre I. Etat de la question - Objectif du travail

I- La Photothérapie dynamique

La photothérapie dynamique (PTD ou PDT pour «photodynamic therapy») représente une alternative émergente, innovante et non invasive de traitement des tumeurs solides malignes[11]. Son principe repose sur l'administration topique ou systémique d'un agent photosensibilisant (PS) qui, activé par la lumière, est capable d'induire la destruction du tissu cible par la génération d'espèces réactives de l'oxygène[12].

A- Généralités et Historique sur la photothérapie dynamique

La PTD est une technique physico-chimique de destruction cellulaire reposant sur l'activation d'un agent PS par une source lumineuse en milieu aérobie.

On a retrouvé des écrits sacrés en Inde, datant de 1400 avant notre ère, révélant l'utilisation de photosensibilisants afin d'améliorer l'efficacité de la photothérapie[13]. Mais, c'est au début du siècle dernier, que Raab décrivait pour la première fois, l'utilisation de la PTD, en rapportant les effets phototoxiques de colorants naturels. Il constatait que le temps de lyse des paramécies par l'acridine orange variait selon l'intensité lumineuse du laboratoire[14]. En 1903, Von Tappenier et Jesionek utilisaient l'éosine activée par de la lumière blanche pour détruire un carcinome épidermoïde (CSC) de la face d'une femme âgée de 70 ans[15]. Ils introduisaient pour la première fois le terme de PTD[16]. Le pouvoir de photosensibilisation d'une porphyrine naturelle, l'hématoporphyrine (Hp), était rapporté par Haussmann et Meyer-Betz quelques années plus tard[17]. Policard découvrait, en 1924, qu'une tumeur maligne éclairée par une lampe à ultra-violet (UV) était capable d'émettre une fluorescence rouge, témoignant de la présence de porphyrine endogène[18]. Pendant la Seconde Guerre mondiale, on observait que l'injection d'Hp à des rats s'accumulait sélectivement dans les tumeurs, et après illumination par une lampe à quartz, provoquait une nécrose tumorale[19]. L'affinité de l'Hp pour les tissus néoplasiques était rapportée par Figge et Weiland en 1948. Schwartz et Lipson observaient en 1960 que l'injection d'une préparation contenant de l'Hp engendrait une fluorescence du tissu

néoplasique visualisable en per opératoire[20,21]. Schwartz obtenait un dérivé d'hématoporphyrine (HpD) en traitant l'Hp par un mélange d'acide acétique et d'acide sulfurique suivi d'une hydrolyse alcaline.

Mais ce sont les travaux de Dougherty qui ont donné, dans les années 70, l'essor à la PDT. Il rapportait les premiers résultats encourageants du traitement de tumeurs cutanées et sous cutanées chez 25 patients en utilisant l'HpD activée par une lampe à Xénon (500 Watts, raie d'émission dans l'ultra-violet). La faible pénétration tissulaire du faisceau lumineux le conduisait à utiliser pour la première fois le laser. Il identifiait le principe actif : un éther ou ester de dihématoporphyrine. La fraction purifiée de l'HpD est alors commercialisée sous le nom de Photofrin®.

B- La Photothérapie dynamique

1. Définition et types

La PTD à visée anti-cancéreuse est une technique physico-chimique innovante reposant sur la destruction sélective des cellules tumorales au sein d'un individu en respectant les tissus sains avoisinants. Elle utilise un photosensibilisant capable de se fixer sélectivement sur les cellules néoplasiques ou d'être retenue par elle. Elle peut être utilisée en cancérologie selon deux axes différents, en thérapeutique et à visée diagnostique [22] (Fig-3).

La PTD thérapeutique est basée sur l'activation d'un agent photosensibilisant par une lumière visible se fixant sélectivement sur la tumeur et aboutissant à une destruction sélective du tissu néoplasique par un mécanisme d'oxydation irréversible.

La PTD photodiagnostique [ou photodiagnostic dynamic (PDD)] permet de détecter avec précision les lésions néoplasiques par l'analyse de la fluorescence émise lorsque le PS est excité par une lumière de longueur d'onde appropriée[23,24] (Fig-4). Ce principe de photodiagnostic est une aide précieuse en *per* opératoire guidant le chirurgien pour obtenir une résection la plus complète et large possible en urologie dans les cancers de vessie, en gynécologie dans les cancers du col utérin, en pneumologie dans les cancers pulmonaires[25,26].

Il est utile pour la surveillance de ces tumeurs malignes en permettant une détection précoce avant la visualisation de lésions macroscopiques et donc d'optimiser les traitements et d'améliorer les pronostics[27].

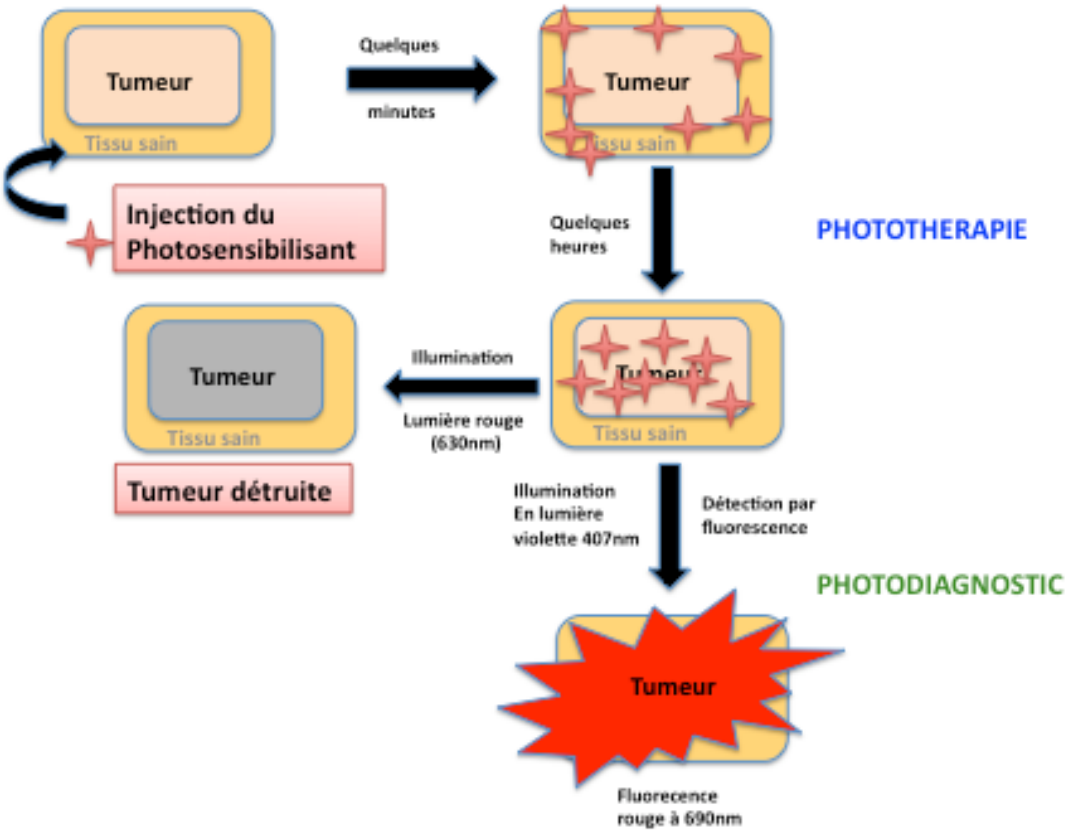


Figure 3 La photothérapie dynamique et le "photodiagnostic" dynamique

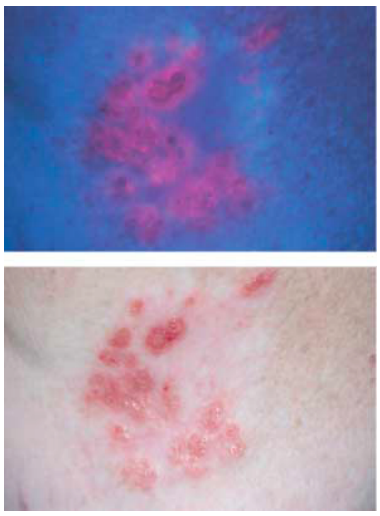


Figure 4 PTD photodiagnostique avec visualisation de l'accumulation de protoporphyrine IX après illumination en limière de Wood d'un carcinome basocellulaire superficiel [28]

Deux types de photothérapie dynamique existent : la PTD systémique et la PTD topique selon le mode d'administration de l'agent photosensibilisant.

La PTD systémique consiste à administrer le PS par voie intra-veineuse ou voie orale (Fig-5). Le PS se dirige sélectivement vers le tissu cible. Puis l'illumination de la zone

provoque la réaction photodynamique [29]. La sélectivité est faible et est à l'origine d'une photosensibilité généralisée rémanente et prolongée des patients traités du fait de l'accumulation de PS dans la peau.

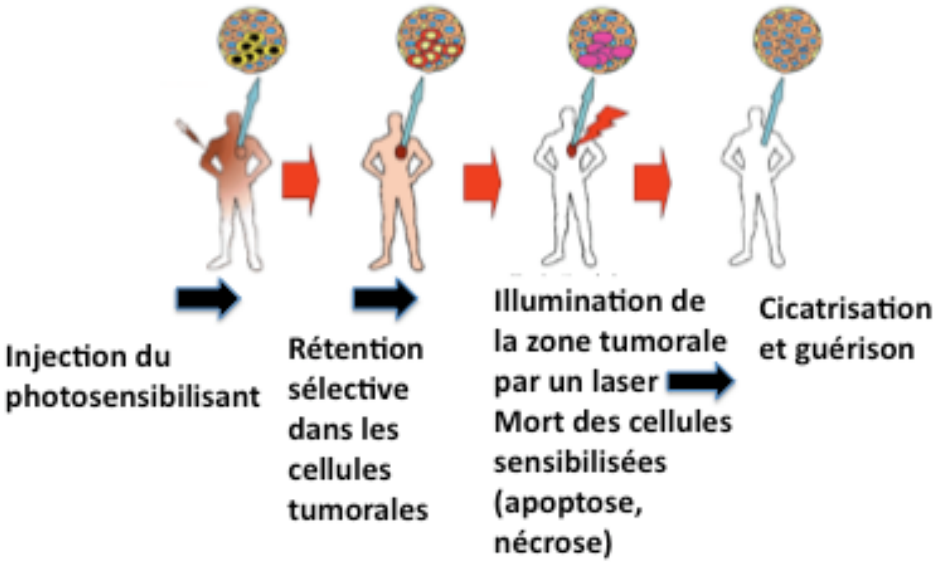


Figure 5 Principe de la PTD systémique

La PTD topique utilise un PS en application locale (solution, émulsion, crème, injection sous cutanée) (Fig-6). Après pénétration du PS, au sein du tissu cible, une stimulation lumineuse provoque une réaction photochimique aboutissant à une destruction tissulaire localisée.

Le développement de la PTD topique, plus sélective et l'absence de photosensibilité rémanente ont permis de nouvelles perspectives d'utilisation de la PTD de nos jours dans de nombreux domaines médicaux et chirurgicaux, en particulier en cancérologie et de manière très logique en dermatologie.

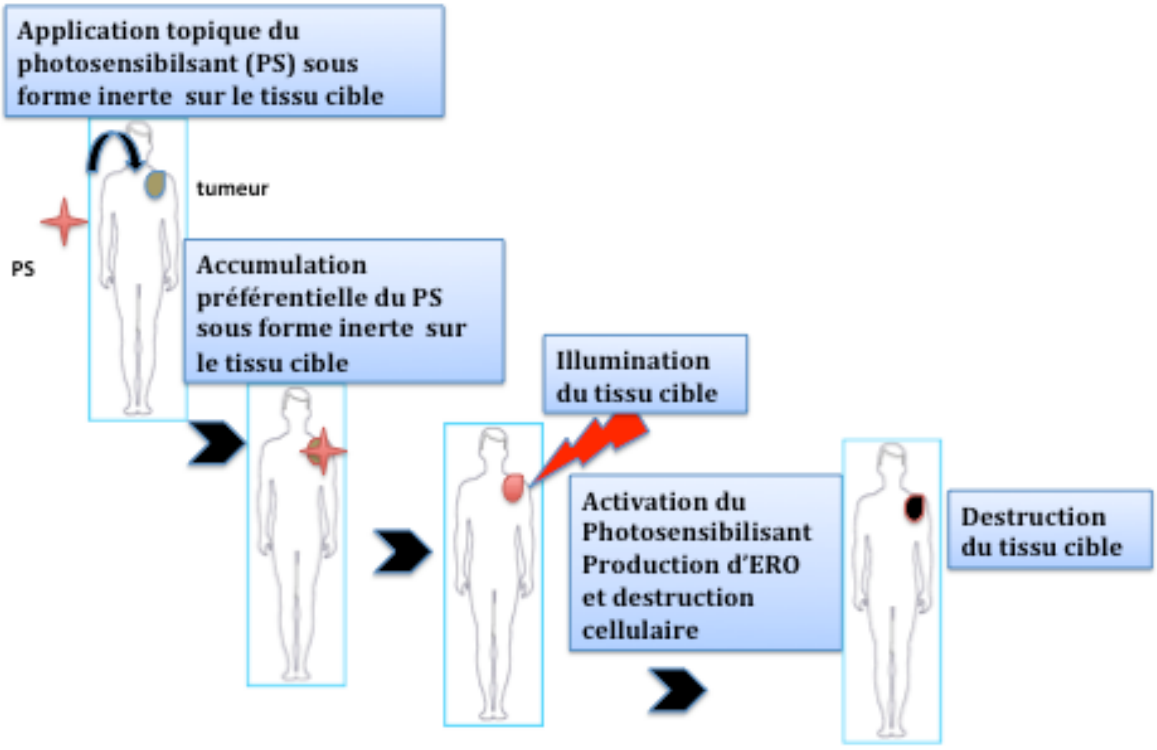


Figure 6 Principe de la PTD topique

2. Principe et mécanismes d'action

a) Principe

Le principe est simple et repose sur l'illumination d'un agent photosensibilisant accumulé sélectivement au sein du tissu cible en présence d'oxygène[30]. La molécule activée par un rayonnement lumineux mono ou polychromatique est capable d'induire une réaction photochimique dont l'accepteur d'énergie est l'oxygène. L'efficacité de la PTD est dépendante de la présence en quantité suffisante dans le tissu (>2%) d'oxygène[31,32]. Ce manque d'oxygène est à l'origine de la production d'HIF1[1] au cours de la PTD[33,34]. La réaction chimique alors enclenchée en présence de lumière provoque la destruction du tissu cible par la production d'oxygène singulet ($^1O_2$) cytotoxique et d'autres radicaux libres[35,36]. La demi-vie et la distance de diffusion de l'oxygène singulet sont des éléments essentiels pour

[1] Les **facteurs induits par l'hypoxie** (ou **HIF**, *Hypoxia Inducible Factors*) sont des protéines agissant comme facteurs de transcription dans tous les tissus et régulés le niveau d'oxygène.

expliquer l'effet photodynamique. Le temps de vie intracellulaire de l'$^1O_2$ est de près de 3 µs[37]. Sa diffusion intracellulaire est estimée à 2-4 10^{-6} cm^2. s^{-1} [38]. La distribution de l'$^1O_2$ dans les tissus tumoraux est souvent hétérogène[39]. Les cellules situées dans les régions tumorales hypoxiques sont plus résistantes à la PTD.

b) Mécanismes d'action

L'émission de fluorescence est utilisée, comme nous venons de le voir, dans un but diagnostique et correspond à une conversion interne. A l'inverse, la conversion intersystème est la base du principe de la PDT thérapeutique avec deux réactions photochimiques de type I et II (Fig-7).

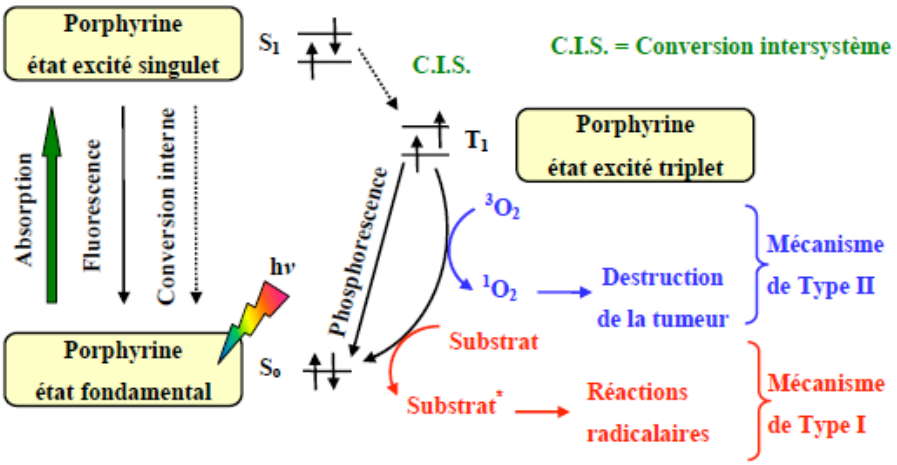


Figure 7 Mécanisme photochimique de la photothérapie dynamique [40]

Au cours de la réaction de type I, le photosensibilisant excité à l'état de triplet est capable de réagir avec l'oxygène moléculaire par transfert d'électron ou d'hydrogène afin de produire des radicaux libres oxygénés. La réaction de type II implique le transfert d'énergie d'excitation vers l'oxygène moléculaire à l'état fondamental (état triplet) pour produire une forme réactive d'oxygène excité, nommé l'oxygène singulet. Ce dernier est capable avant sa désactivation de réagir avec le substrat provoquant des altérations structurales et fonctionnelles de protéines membranaires et la peroxydation de lipides insaturés. Il est admis que l'oxygène singulet est l'agent toxique principal de la PTD[35].

Des études ont montré que le mécanisme de type II est prédominant en PTD avec des porphyrines. A noter que l'oxygène singulet formé peut réagir avec le PS et le détruire par ouverture du macrocycle. Cette dégradation, appelée « photobleaching » ou « blanchiment » est une conséquence des réactions de type I et II. Ce phénomène correspond à la perte du

pouvoir sensibilisant après l'exposition à la lumière, c'est-à-dire à la destruction du photosensibilisant par l'oxygène singulet et les radicaux libres[41,42].

L'ensemble de ces processus entraîne la dégradation d'un grand nombre de constituants cellulaires conduisant à la mort cellulaire par nécrose ou plus souvent par apoptose. Les mécanismes de mort cellulaire induite par la PTD initialement rapportés se résumaient à des phénomènes de nécrose[36,43], tandis que Agarwal *et al* décrivait une mort par apoptose de cellules tumorales au cours de la PTD[44]. La compétition entre ces deux mécanismes est contrôlée par plusieurs paramètres tels la nature du PS et la concentration en oxygène. La localisation mitochondriale du PS est classiquement associée à un processus de mort apoptotique alors que la localisation membranaire plasmique est à l'origine d'une mort cellulaire par nécrose[12,45]. Cependant, l'intensité de la réaction photodynamique peut provoquer une lyse cellulaire brutale et rapide, correspondant à la nécrose plutôt qu'une mort contrôlée par apoptose[46].

Le mécanisme d'action dépend d'un certain nombre de facteurs : le type cellulaire[47,48], les doses de PS et d'énergie délivrée[49,50], le taux d'adénosine triphosphate (ATP)[51], le pH intra-tumoral[52] et la biodistribution du PS[53]. Les PS n'atteignent pas pour la plupart le noyau cellulaire, il ne se produit pas de dommages à l'ADN. Par conséquent, la PTD n'entraîne pas de mutations et de risque de cancérogénèse au sein des tissus sains[54]. Quelques minutes après l'illumination activant le PS localisé sur les membranes plasmatiques, des dommages membranaires s'observent : dépolarisation, libération d'enzymes cytosoliques et lysosomiales, inhibition des activités Na^+K^+- adénosine triphosphate (ATPase) et Mg^{2+}-ATPase, régulation des antigènes de surface, peroxydation lipidique…[12]. Des publications plus récentes font état de l'activation d'un processus d'autophagie avec certain PS [55,56].

Bien que les propriétés curatives de la PTD soient dues à un effet photocytotoxique direct en induisant un stress oxydatif, des effets indirects renforcent son efficacité. On a observé une mort cellulaire par ischémie provoquée par la destruction des vaisseaux sanguins[57], une activité anti-tumorale des cellules inflammatoires, et une réaction auto-immune anti-tumorale[58]. La réaction inflammatoire déclenchée par la PTD, est à l'origine du recrutement et de l'activation des leucocytes plasmatiques, de macrophages, de monocytes et de mastocytes dans les tissus tumoraux[59,60]. Ces polynucléaires neutrophiles libèrent des radicaux libres et oxygénés, des myeloperoxydases et des enzymes lysosomiales contribuant aux dommages tissulaires. Ils sont responsables de l'attraction de cellules immunocompétentes[57]. La déplétion de polynucléaires neutrophiles chez des souris montre une baisse d'efficacité de la PTD soulignant le rôle de cette réaction inflammatoire induite par les globules blancs. Et à

l'inverse, l'accroissement du nombre de polynucléaires neutrophiles par du G-CSF, améliore l'efficacité de la PTD[61]. Les cellules immunes sont capables de phagocyter les cellules tumorales mortes. Elles présentent en suite à leur surface les peptides tumoraux, créant des signaux et la reconnaissance par les lymphocytes T helper. Les lymphocytes B et les cellules Natural-Killer (NK) sont activés lors de la PTD, mais leur rôle est mal connu. Bien que la PTD soit une thérapeutique locale, la réaction immune déclenchée a des effets systémiques intéressants pour le traitement des tumeurs métastatiques[57].

Le stress oxydatif provoqué par la PTD induit une élévation transitoire et précoce de l'expression de gènes *c-fos, c-jun, c-myc* et *erg-1*[62]. La PTD avec la benzoporphyrine déclenche la production de protéine kinase (SAPK stress-activated protein kinase, ERK1 et 2) par les kératinocytes[63]. La PTD induit l'expression des « Heat Shock Protein »[64]. L'expression de certaines molécules influence l'efficacité de la PTD. Après transfection d'un ADNc correspondant à Bcl-2 (un anti-apoptotique)dans les fibroblastes de Hamster, l'efficacité de la PTD est moindre par blocage des phénomènes apoptotiques [65]. Les cellules leucémiques promyélocytaires humaines (HL-60) mutées sur le gène *p53* sont moins photosensibles en PTD, de même que les cellules carcinomateuses coliques [66,67].

c) Mécanismes immunologiques et voies de signalisation

In vivo, la PTD est à l'origine d'une réaction immune complexe. Cette technique se développe dans le traitement des pathologies auto-immune et vasculaire. Elle a démontré son efficacité dans le traitement des arthrites dans des modèles animaux de polyarthrite rhumatoïde[68], et des modèles expérimentaux d'encéphalomyélite auto-immune[69]. La PTD est capable de supprimer les processus auto-immuns. Elle peut altérer les capacités de présentation antigénique des cellules immunocompétentes, et de diminuer les molécules de costimulation (CD80, CD 86) exprimées à leur surface [70]. La PTD augmente l'expression de l'interleukine 6 (IL-6) par transcription du facteur AP-1 et d'IL-10 dans les tissus tumoraux et sains *in vivo*[60,71]. Elle peut augmenter l'expression d'autres cytokines : IL-1β, IL-2, Tumor necrosis factor-α, interféron γ et G-CSF par de nombreuses cellules comme les leucocytes et les cellules tumorales. Elle peut aussi activer la voie de NF-κB qui est nécessaire à la régulation de gènes immunologiquement importants IL-6, ICAM-1 et VCAM-1[72-75](Fig-8).

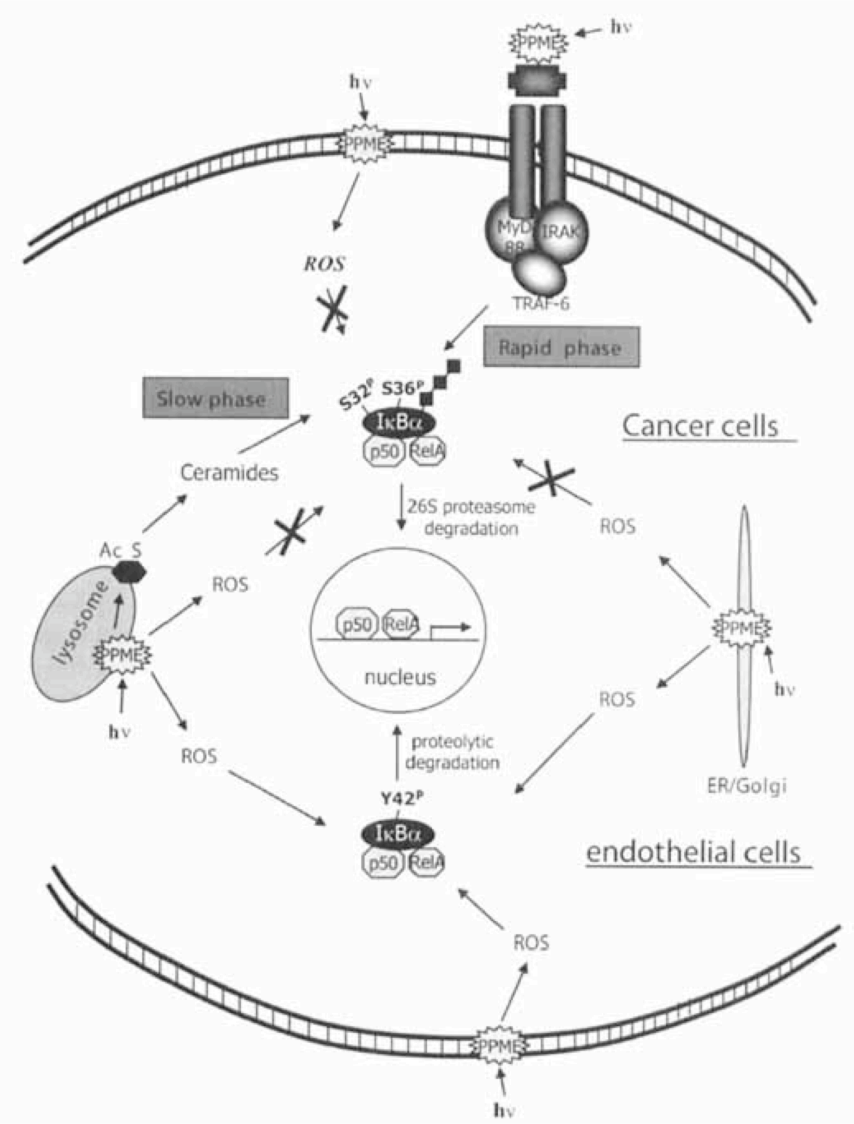


Figure 8 - Activation de NF-KappaB après PTD [73]

On observe la diminution de la production d'ICAM-1 et de VCAM-1 après la PTD [75]. Cette perte d'expression pourrait expliquer une diminution du potentiel métastatique des cellules cancéreuses[76]. Par ailleurs, des taux élevés de Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 sont associés à une faible réponse à la PTD. La PTD est à l'origine de l'activation de voies de signaux de transduction (Fig-9).

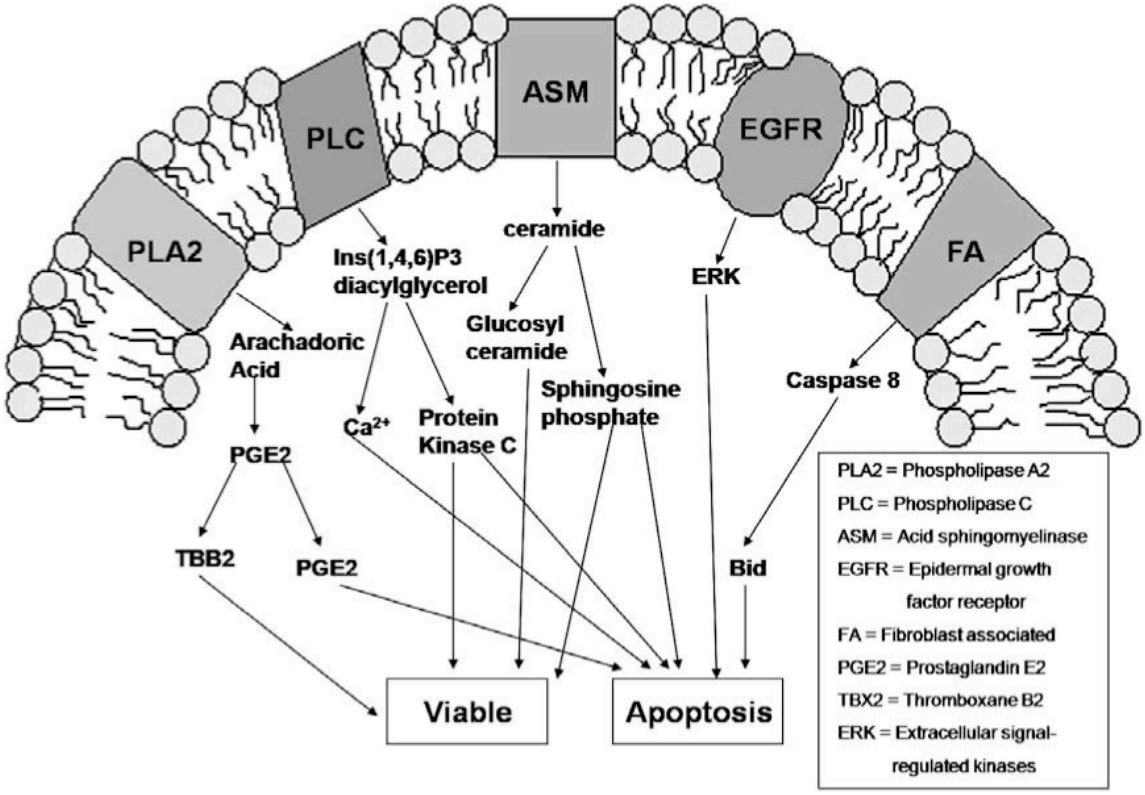


Figure 9 - Cascade de signaux de transduction activée par la PTD [77]

La PTD est à l'origine d'une élévation du calcium intra-cellulaire au sein des cellules cancéreuses *in vitro*. Ces variations de concentration de calcium intra-cellulaire joueraient un rôle dans les phénomènes d'apoptose après PTD[78].

Des métabolites de l'acide arachidonique sont détectées après PTD et sont liés à l'activation de la phospholipase A2.

Les taux de céramides après PTD sont élevés. Les céramides sont capables d'activer des protéines kinase et phosphastases impliqués dans les cascades de signaux de stress.

La PTD intervient dans la cascade des tyrosines kinases. En effet, l'expression de ERK est diminuée et est corrélée à une augmentation de la mort cellulaire[79]. Plusieurs études ont démontré une perte complète de l'expression du récepteur de l'épidermal growth factor (EGF) et montré qu'il était à l'origine de processus d'anti-prolifération et d'apoptose [80].

La PTD est capable d'influencer l'activation ou l'inhibition de l'expression de certains facteurs transcriptionnels [81].

Les mécanismes de mort cellulaire au cours de la PTD incriminés sont des mécanismes empruntant les voies apoptotiques ou des phénomènes de nécrose[81]. En général, les faibles doses en PTD provoquent une autophagie (mitophagie/survie) ou une apoptose et les fortes

doses sont à l'origine de phénomène de nécrose[82]. La cible la plus importante lors d'une PTD est l'activation de la famille de protéine pro-apoptotique Bcl. Les dommages de Bcl-2 par la lumière induit l'apoptose au sein des cellules cancéreuses. L'expression de Bcl-2 est un bon indicateur d'efficacité de la PTD[76]. D'autre part, la présence de caspases 3 et 9 est indispensable au processus apoptotique déclenché par la PTD[83].

3. Les Sources lumineuses

L'effet photodynamique est obtenu en PTD lors de l'exposition du tissu cible à une source lumineuse dont la longueur d'onde d'activation doit correspondre à la longueur d'onde d'excitation du PS utilisé. En photothérapie dynamique, la source lumineuse doit émettre à des longueurs d'onde comprises dans le spectre d'absorption de l'agent photosensibilisant. Plusieurs types de sources lumineuses sont utilisés en PTD.

a) Les types de sources lumineuses

Plusieurs types de sources lumineuses sont disponibles et ont été utilisées en dermatologie[84]. Peu d'études randomisées comparant les sources de rayonnement sont disponibles dans la littérature. Une étude démontre une équivalence d'efficacité d'une source laser et d'une lampe halogène dans le traitement de CBCs[85]. Clark *et al* montraient une différence en terme de tolérance entre certaine source laser et les lampes sans différence en terme d'efficacité [86].

Ce sont les lasers argon ou à vapeur de métaux qui ont, historiquement, été les premiers à être utilisés en PTD. Ce sont des sources de rayonnement monochromatique et cohérent, puissant, permettant de réduire les doses énergétiques finales de PTD. Ce caractère monochromatique (une longueur d'onde spécifique/ laser) nécessite la connaissance de longueur d'onde d'excitation du PS.

Les lasers Argon à colorants (Rhodamine B, Rhodamine 101, sulforhodamine 640) ont deux pics principaux d'émissions à 488-514 nm et à 600-650 nm qui correspondent au maximum d'absorption des porphyrines. Ils nécessitent une maintenance technique rigoureuse limitante. L'intensité énergétique est élevée à 0,5-1W/cm^2. La possibilité de coupler une source laser à

une fibre optique permet de traiter les tumeurs pulmonaires, vésicales et oesophagiennes par voie endoscopique.

Les lasers à vapeur de métal (à vapeur d'or, ou de cuivre à 700 nm, à colorant pulsé par Argon en continu, Nd : YAG, KTP), permettent le traitement de lésions peu étendues, de diminuer les durées d'exposition et de sélectionner les longueurs d'onde appropriées. Leur intensité énergétique est plus faible de l'ordre de 10-100 mW/cm^2.

Les lasers diodes sont capables d'émettre de la lumière entre 630-980 nm et possèdent un faisceau transmis par une fibre optique utile pour la PTD endoscopique.

Parmi les sources lumineuses autres que les lasers, on distingue les lampes à filament métallique halogène, à xénon et fluorescence qui sont plus efficaces que les lasers lorsqu'il s'agit de traiter des lésions étendues et peu profondes. De plus, leur entretien est plus facile et moins coûteux que pour les sources lasers. L'efficacité thérapeutique de la PTD est améliorée car on peut irradier avec de multiples longueurs d'onde. Toutefois, la dosimétrie de la lumière visible est moins précise que celle d'un laser mais on peut activer plusieurs PS de longueurs d'onde différentes. Par contre, la lumière infrarouge parasite provenant d'une émission à large bande (souvent dans les sources lumineuses rouges) peut être au delà de 150 mW/cm^2 à l'origine d'une augmentation de la chaleur cutanée, des dégâts hyperthermiques et par voie de conséquence de douleur[3,87].

Les lampes halogènes filtrées, comprenant les lampes fluorescentes à basse pression et les diodes électroluminescentes ou Light-Emitting Diode (LED) sont des sources de lumière non cohérente les plus couramment utilisées (Fig-10). Ces LED ont l'avantage de produire moins de chaleur et une illumination suffisante du tissu cible pour des temps réduits. Elles émettent dans le bleu et le rouge et des surfaces importantes peuvent être traitées.

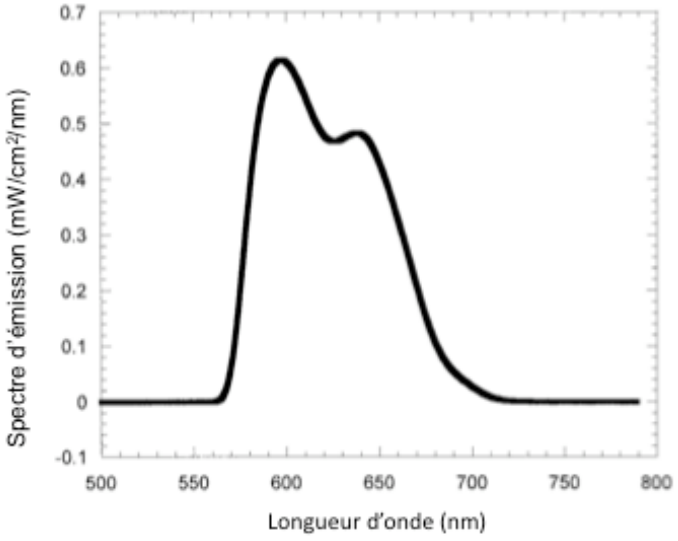


Figure 10 - Spectre d'émission de la lampe Photocure ™

Les lampes sont plus adaptées au traitement des lésions cutanées, car elles ne peuvent pas être couplées à des fibres optiques pour les traitements endoscopiques.

Les lampes à fluorescence ont été développées en PTD car on peut activer les PS à une longueur d'onde où leur concentration est maximale proche de la bande de Soret (400-450 nm). On peut ainsi utiliser moins de PS, mais la profondeur de pénétration est plus faible.

La lampe PhotoCure™ et la Cosmédico™ émettent de la lumière rouge entre 570-670 nm, à 75 J/cm^2 et une intensité de 200 mW/cm^2. Tandis que la lampe Waldmann 450L émet à 420 nm, et à 10 J/cm^2. Enfin, l'Aktilite™ illumine en rouge (630 +/- 3 nm et à 37 J/cm^2).

D'autres paramètres d'illumination sont importants à respecter. C'est par exemple l'intervalle de temps entre l'application du PS et celui de l'éclairage afin que la molécule puisse être à concentration efficace. D'autre part, la durée d'illumination doit être très contrôlée afin de délivrer la quantité d'énergie nécessaire. Ils prennent en compte la cinétique d'élimination du photosensibilisant[88]. Une faible puissance (30 mW/cm^2) est préférable du fait de la déperdition en oxygène lors de l'utilisation de puissance élevée (75 mW/cm^2) pour le traitement des kératoses actiniques[89]. La consommation d'oxygène est en effet plus importante lors des puissances élevées pendant la PTD [90].

Certains auteurs préconisent l'illumination fractionnée pour augmenter l'efficacité de la PDT, ceci favorise la réoxygénation de la tumeur et par conséquent la production ultérieure d'oxygène singulet[91].

b) Les différentes longueurs d'onde et les couleurs

La longueur d'onde de la lumière d'excitation est adaptée au spectre d'absorption de la substance photosensibilisante et à la profondeur du tissu à traiter (Fig-11). La pénétration de la lumière à travers l'épiderme humain et le *stratum cornéum* a fait l'objet d'études et diffère en fonction de la longueur d'onde : plus la longueur d'onde est élevée plus le faisceau pénètre profondément[92]. Ainsi, la lumière bleue est plus efficace pour activer le PS mais a l'inconvénient de pénétrer moins profondément dans les tissus[93].

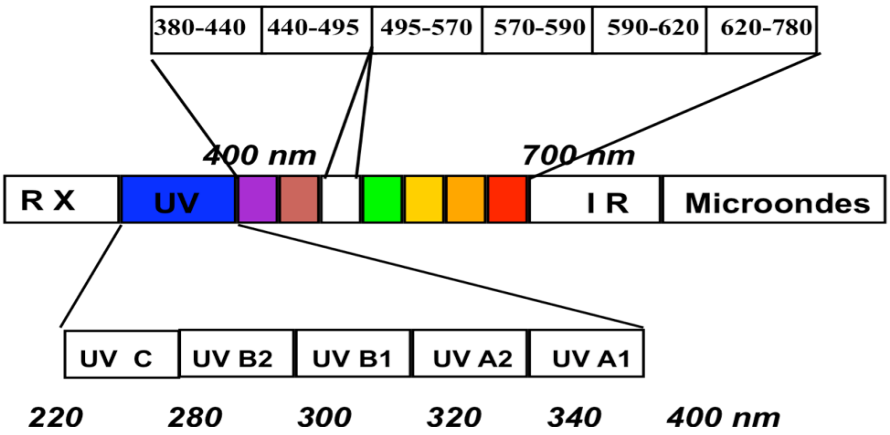


Figure 11 - Les différentes longueurs d'onde des rayonnements

La plupart des essais cliniques actuels utilisent la lumière rouge (630 nm) comme source lumineuse, car elle pénètre plus profondément dans les tissus que les longueurs d'onde plus courtes de la lumière visible[36,94] (Fig-12). La longueur d'onde de la source lumineuse doit être proche du pic d'absorption maximale du PS utilisé. Le maximum d'absorption de la PpIX est de 630 nm dans le spectre rouge. C'est pourquoi la plupart des études avec de AAL en PDT se font en lumière rouge, afin d'augmenter la profondeur de pénétration du faisceau. Ainsi, elle est plus efficace pour traiter des tumeurs plus profondes par rapport à la lumière bleue ou verte. Des auteurs obtenaient 94 % de taux de réponse complète (TRC) en lumière rouge, et 72% en illuminant en lumière verte dans le traitement des maladies de Bowen[95]. A l'inverse, la lumière verte est aussi efficace et engendre moins de douleur que la lumière rouge pour le traitement de lésions plus superficielles comme les kératoses actiniques[96]. Cependant le spectre d'émission/excitation de la PpIX présente un maximum d'excitation à 410 nm et 3 pics plus petits à 510, 545 et 580 nm. La lumière verte (514 nm) pénètre à 0,4 cm de profondeur et active le Photofrin® significativement mieux qu'en lumière rouge. La lumière

violette (400-450 nm) couvre le spectre d'excitation de la PpIX[97]. Par conséquent, elle est 10 fois plus efficace que la lumière rouge[92] (Fig-13).

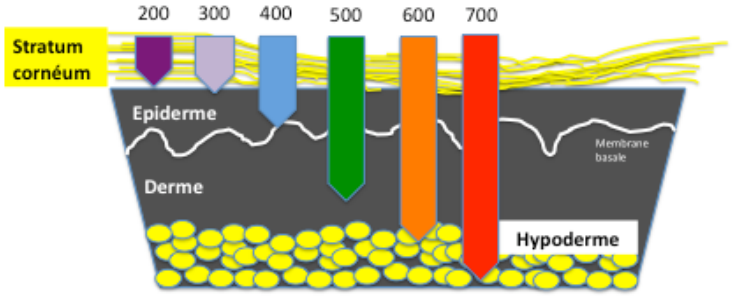


Figure 12 - Profondeur de pénétration de la lumière dans la peau en fonction de la longueur d'onde

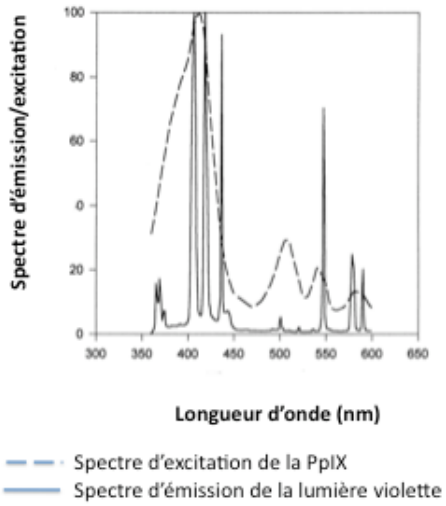


Figure 13 - Spectre d'Emission/Excitation de la PpIX et source lumineuse violette[97]

La profondeur de pénétration de la lumière visible varie de 4 mm lorsque la longueur d'onde est comprise entre 500 et 600 nm à 8 mm pour des longueurs d'onde proche de 800 nm. Les effets biologiques avec des longueurs d'onde entre 600 et 800 nm s'observent jusqu'à 2,5 cm de profondeur. Des effets biologiques, tels la production de facteurs de croissance des macrophages et la cicatrisation de plaies post-opératoires ont été rapportés avec la lumière rouge [98,99]. Par ailleurs, les lampes de lumière bleue ou rouge contiennent une faible fraction d'ultra-violet (9% dans la lumière bleue et 7% dans la lumière rouge) ce qui pourrait expliquer une partie de l'effet clinique.

4. Les photosensibilisants

Les agents photosensibilisants doivent être stables et purs. Le photosensibilisant (PS) doit être inerte et non cytotoxique en l'absence de lumière, posséder une absorption maximale à la longueur de la lumière utilisée, être sélectif afin de détruire le tissu cible et non les tissus avoisinants. Il doit être amphiphile afin de s'incorporer dans les structures cellulaires (hydrophile pour les lysosomes, et hydrophobe pour les mitochondries). Les cibles cellulaires des PS sont essentiellement la mitochondrie[100], le lysosome[101,102] et les membranes plasmiques[103]. Il doit avoir une clairance d'élimination forte pour éviter des photosensibilités prolongées. Enfin, il faut qu'il induise une production d'oxygène singulet élevé, afin d'induire des réactions photochimiques importantes. Il doit aussi posséder une forte absorption de la lumière rouge, afin que l'effet thérapeutique de la PTD soit le plus profond possible.

Les PS les plus couramment utilisés en PTD se répartissent en deux groupes : les PS non tétrapyrroliques (PS non porphyrinique) et les PS tétrapyrroliques (les porphyrines)[104]. Ces derniers se divisent en 3 classes :

- les PS de première génération : les molécules d'origine naturelle,
- les PS de deuxième génération : les molécules de synthèse,
- les PS de troisième génération : les molécules vectorisées.

Les propriétés photophysiques et photochimiques des PS sont à l'origine de leur spécificité et de leurs applications en cancérologie. Leurs longueurs d'onde d'absorption maximale guident les indications en fonction de la profondeur de la lésion tumorale à traiter. En effet, la profondeur de pénétration de la lumière dépend de la longueur d'onde du rayonnement utilisé, mais aussi de la richesse du tissu en molécules capable d'absorber la lumière incidente (hémoglobine, mélanine…). Les séances de PTD peuvent être répétées sans être gênées par des problèmes d'accumulation. Les PS utilisés possèdent un coefficient d'extinction molaire. Il caractérise l'intensité de l'absorption lumineuse et doit être élevé dans la bande utilisée pour l'excitation. Par conséquent, plus le coefficient est élevé plus la dose efficace sera faible.

Beaucoup d'avantages sont liés à l'utilisation de porphyrines. Elles pénètrent profondément dans les tissus cibles (Lutrin®, Foscan®), et elles présentent une galénique et une formulation simplifiées (Levulan®, Foscan®, NPe6). Les inconvénients sont principalement dus à leur manque de solubilité, à une photosensibilité rémanente prolongée, (Photofrin®, Foscan®, Purlytin®), à une certaine cytotoxicité en l'absence de lumière (Purlytin®), à des douleurs pendant les séances de PTD (Lutrin®, Levulan®), une formulation complexe (Lutrin®) et une destruction tumorale des tissus cibles limitée en profondeur (Levulan®, Metvix®). Ces

derniers ont favorisé le développement de substances non porphyriniques avec des demi-vies plus courtes, mais leurs effets secondaires ont limité leur utilisation. Malgré le nombre sans cesse croissant de nouveaux PS, l'appariton d'une troisième génération de molécules tend à résourdre quelques uns des inconvénients cités ci-contre.

4.1 Les Porphyrines- Généralités

Historiquement, ce sont les porphyrines qui ont été un des premiers photosensibilisants utilisés en PTD pour traiter des cancers de la vessie, de l'œsophage, du poumon, de l'estomac, de la peau et du cancer du col de l'utérus [28].

Une porphyrine est un macrocycle aromatique constitué de 4 sous-unités pyrroliques reliées par des ponts méthines (Fig-14). Ce macrocycle tétrapyrrolique possède un système de 18 électrons π qui lui confère un fort caractère aromatique. C'est ce système π qui est à l'origine de leur forte absorption dans la lumière visible de ces composés.

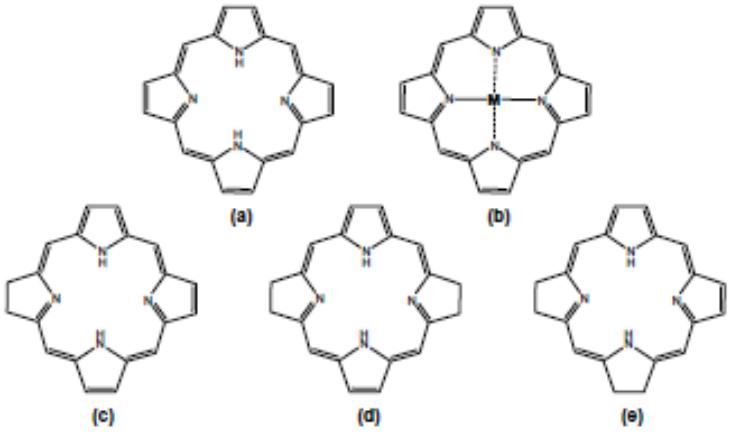


Figure 14 - Exemple de composés tétrapyrroliques: la porphyrine base libre (a) ; porphyrine métallée (b) ; chlorine (c) ; bactériochlorine (d); isobactériochlorine (e)

Les porphyrines, se comportant comme des diacides ou des dibases, elles peuvent se combiner à des métaux (manganèse, fer, cobalt, cuivre, zinc…). Elles peuvent être partiellement réduites (une double liaison) en ôtant une unité pyrrolique pour former des chlorines. Lorsque deux doubles liaisons sont hydrogénées, on parle de bactériochlorine ou d'isobactériochlorine selon la position des pyrroles réduits.

Une nomenclature systématique est utilisée pour définir les différents types de porphyrine (Fig-15). Les positions des méthines sont appelées « méso » et sont notées α, β, γ, et δ dans la

nomenclature de Fischer. Elles portent les numéros 5, 10, 15 et 20 dans la nomenclature systématique qui a vu le jour avec l'arrivée des porphyrines de synthèse compte tenu de leur complexité. Dans cette dernière nomenclature, les carbones α et β pyrroliques sont désignés par respectivement les numéros 1, 4, 6, 9, 11, 14, 16, 19 et 2, 3, 7, 8, 12, 13, 17, 18 ; les 4 atomes d'azote sont eux numérotés de 21 à 24. Dans la nomenclature de Fischer, les carbones β-pyrroliques sont numérotés de 1 à 8 alors que les carbones α-pyrroliques et les atomes d'azote ne le sont pas. Au sein des porphyrines β-pyrroliques, les substituants peuvent être disposés de différentes manières autour du macrocycle, appelés par Fischer, des « isomères types » et nommés I, II, III, IV, etc.

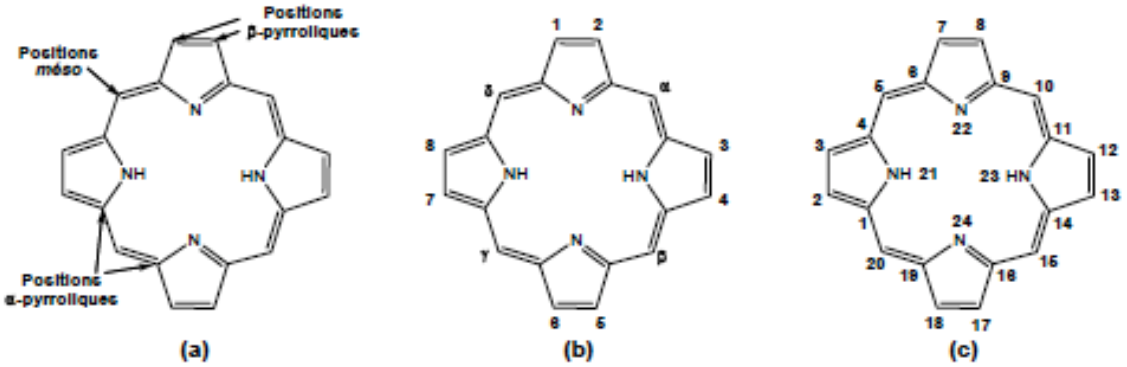


Figure 15- Les différentes nomenclatures : appellation générale (a) ; nomenclature de Fischer (b) ; nomenclature systématique (c)

Les substituants portés par les carbones *méso*, comme par exemple les groupements phényles, s'orientent hors du plan du macrocycle de sorte à limiter les interactions stériques avec les hydrogènes β-pyrroliques. Ces interactions dans le cas des méso-arylporphyrines substituées en *ortho,* sont à l'origine de l'existence d'atropoisomères notés aaaa, αβaa, αβαβ, αββα (Fig-16).

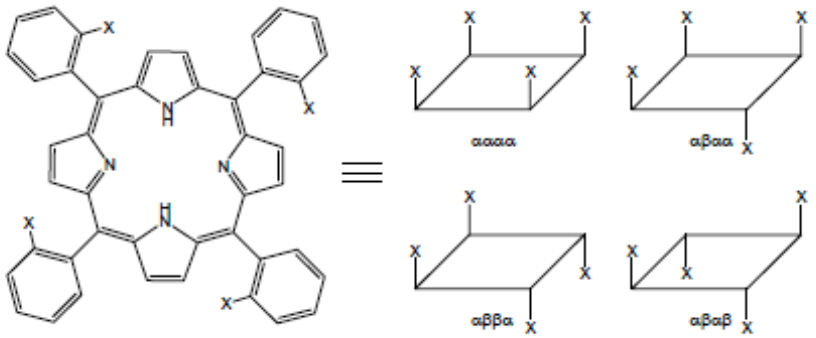


Figure 16 - Représentation schématique des atropoisomères de méso-arylporphyrines.

Les porphyrines possèdent un système d'électron π fortement conjugué. Elles absorbent dans le domaine du visible et présente un spectre d'absorption très caractéristique. Les porphyrines sont absorbées au maximum (ε > 100000 $L.mol^{-1}.cm^{-1}$) dans la bande de Soret (360-400 nm) ou bande B et présentent 4 pics d'absorption de moindre intensité entre 500 et 635 nm (bande Q)[2] (Fig-17).

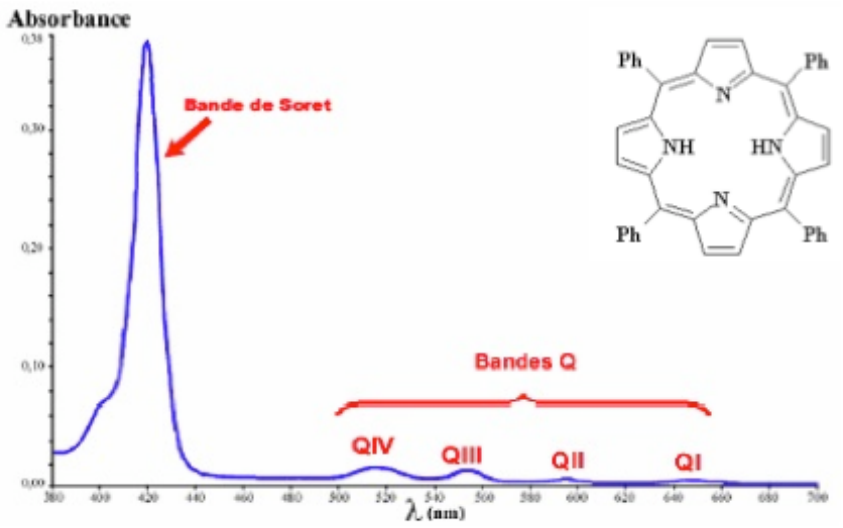


Figure 17 - Spectre UV-Visible caractéristique d'une porphyrine base libre de type méso

En perturbant le système π, il est possible de modifier le spectre d'absorption des macrocycles. Ainsi, la substitution des carbones méso par des azotes dans les tétra-azaporphyrazines déplace la bande d'absorption vers le rouge.

4.2 Les photosensibilisants de première génération

a) L'hématoporphyrine dérivée

L'hématoporphyrine dérivée (HpD) est le premier PS utilisé en clinique par Lipson[20]. Il a été obtenu par acétylation du dihydrochlorhydrate d'hématoporphyrine obtenue à partir de l'hémoglobine de sang séché, avec un mélange d'acide sulfurique et d'acide acétique à 5% suivie d'une neutralisation du produit par une alcalinisation (Fig-18).

---

[2] Le spectre se compose d'une bande intense (e > 100000 $l.mol^{-1}.cm^{-1}$) entre 390 et 430 nm (proche UV) appelée bande de Soret ou bande B et de quatre autres bandes situées entre 480 et 700 nm (Visible) d'intensité dix à vingt fois plus faible appelées bandes Q. Les quatre bandes Q, numérotées de I à IV en partant des énergies les plus basses, voient leurs intensités relatives varier notablement en fonction de la nature et de la position des substituants.

.

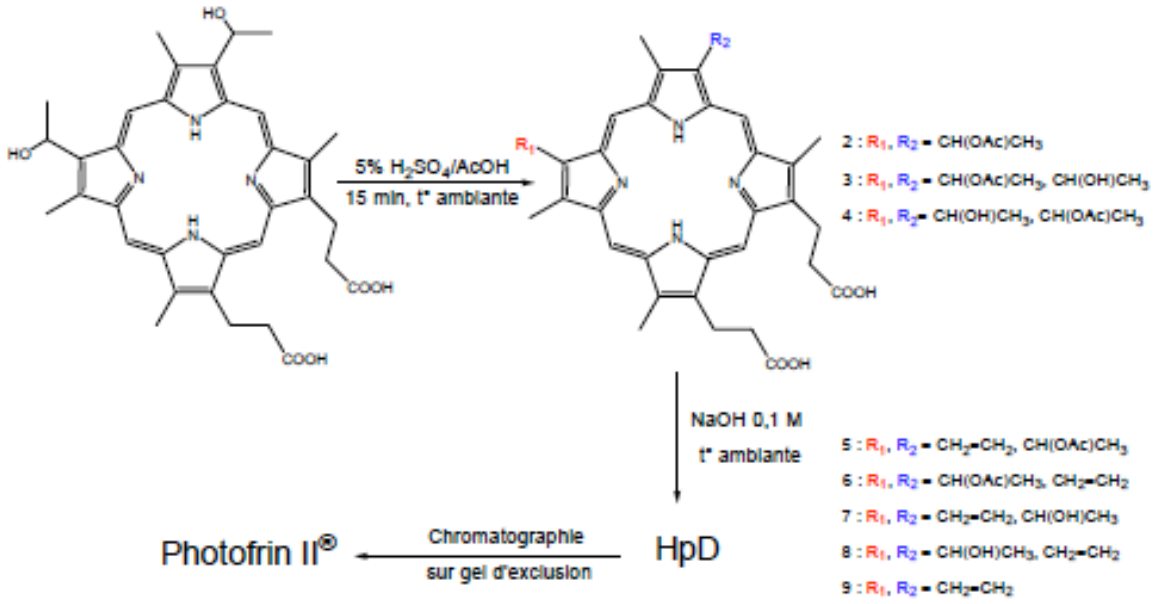


Figure 18 - Réaction d'obtention de dérivés d'Hématoporphyrine

L'étude en chromatographie liquide haute performance de l'HpD par Dougherty démontre qu'il s'agit d'un mélange complexe de porphyrine : 20% d'hématoporphyrine (Hp), 20 à 30% d'hydroxyéthylvinyldeutéroporphyrine sous deux formes isomériques (HvD1 et HvD2), 3 à 5% de protoporphyrine IX (PpIX) et 50% d'un mélange constitué d'oligomère sous forme d'éther et/ou d'esters d'hématoporphyrine[12]. Il est très difficile d'obtenir un composé pur d'Hp. Ce sont les nombreux oligomères qui sont probablement à l'origine de la photocytotoxicité. Malgré tous les inconvénients de cet agent photosensibilisant, l'HpD est le premier PS ayant obtenu l'autorisation de mise sur le marché pour une utilisation de la PTD anti-tumorale humaine.

b) Le Photofrin®

Le Photofrin II®, porfimer sodique ou dihématoporphyrine éther, a été le premier photosensibilisant commercialisé et utilisé dans la plupart des premiers essais cliniques[22]. Il a été élaboré à partir de l'hématoporphyrine et est enrichi à 80-90% de DiHématoporphyrine Ether (DHE)[105]. Il s'agit d'un mélange de nombreuses porphyrines avec, de ce fait, des propriétés pharmaceutiques difficiles à étudier[106]. Son spectre d'absorption se caractérise par une bande de Soret vers 420 nm et 4 autres bandes de plus faible intensité vers 500, 540 et 630 nm. Bien qu'il présente une faible absorption à 630 nm, c'est la longueur qui est utilisée en PTD afin de permettre une excitation aussi profonde que possible dans les tissus. Son

coefficient molaire d'extinction de 1170 $M^{-1}cm^{-1}$ nécessite une forte concentration pour être efficace en cancérologie[107]. Les mécanismes d'action du Photofrin® sont des dommages vasculaires avec des phénomènes hypoxique et thrombotique, une nécrose tumorale par ischémie, une inflammation locale intense avec une réaction immunitaire[108].

Il a prouvé une photocytotoxicité efficace pour le traitement de nombreux cancers solides. Son administration intraveineuse (2 mg/kg), donc systémique suivi 24 à 48h après d'une illumination, est alors autorisée pour la première fois en 1993 au Canada pour le traitement des cancers de la vessie et aux Etats-Unis depuis 1995 pour le traitement des stades avancés des cancers de l'œsophage et du poumon. En France, il a obtenu l'autorisation de mise sur le marché en 1997 pour le traitement des rechutes des cancers bronchiques non à petites cellules et des cancers de l'œsophage en rechute. Depuis, les indications se sont élargies aux stades précoces et tardifs des cancers du poumon, de l'œsophage, de la vessie, des cancers cutanés, les sarcomes de Kaposi, les œsophages de Barrett avec foyers dysplasiques, les cancers cérébraux et ORL. Dans les stades précoces et inopérables des cancers pulmonaires, la PTD-Photofrin® est un traitement néo-adjuvant de la chirurgie, de la radiothérapie ou de la chimiothérapie.

Sa photosensibilité rémanente prolongée liée à une longue demi-vie de 452 h (jusqu'à 3 mois), du fait d'une faible clairance d'élimination, son manque de sélectivité et son mode d'administration sont à l'origine de la recherche d'autres photosensibilisants et d'autres moyens d'administration[5,109,110].

4.3 Les photosensibilisateurs de deuxième génération

D'autres agents photosensibilisants administrés par voie systémique ont été développés par la suite. Leur inconvénient majeur était une longue rémanence confinant les patients dans l'obscurité pendant 2 à 4 semaines à cause de la photosensibilité, ceci rendant par conséquent leur utilisation compliquée. De ce fait, des travaux ont porté sur la recherche de nouveaux agents photosensibilisants topiques ou d'autres agents photosensibilisants systémiques.

D'autres substances photosensibilisantes, non porphyriques, dites de seconde génération, ont été développées et utilisées en photothérapie dynamique. Ce sont des dérivés des benzoporphyrines, des chlorines et des phthalcyanine-4[111]… Les composés sont plus purs et le site de localisation a été souvent identifié par microscopie confocale[53]. Les cibles cellulaires de la PTD varient volontiers en fonction du PS choisi. On peut citer les

mitochondries (porphycéne monomérique) [100], les lysosomes (chlorine p6)[101], les membranes plasmiques (porphyrine cationique)[103] et les noyaux des cellules tumorales[36]. La plupart de PS synthétiques absorbent fortement dans les longueurs d'onde rouges et possèdent un rendement quantique de formation de l'oxygène singulet élevé.

a. Acide δ amino-lévulinique (AAL)

Les molécules actuellement les plus utilisées par voie topique sont des composés précurseurs des porphyrines. Parmi celles-ci principalement l'AAL est le principal utilisé ainsi que sa forme estérifiée le méthyl-aminolévulinate (MAL) [112].

α- La photosenbilisation endogène

La photosensibilisation endogène est un mécanisme capable de générer des molécules photosensibilisantes à partir d'une substance naturellement présente dans l'organisme et dans un but thérapeutique. Une de ces substances est l'AAL, intervenant dans les voies de la biosynthèse de l'hème ; c'est le précurseur naturel de la protoporphyrine IX (PpIX). Il constitue un PS endogène actif (Fig-19). La découverte de l'AAL a accéléré le développement de la PDT topique dans de nombreux domaines biomédicaux.

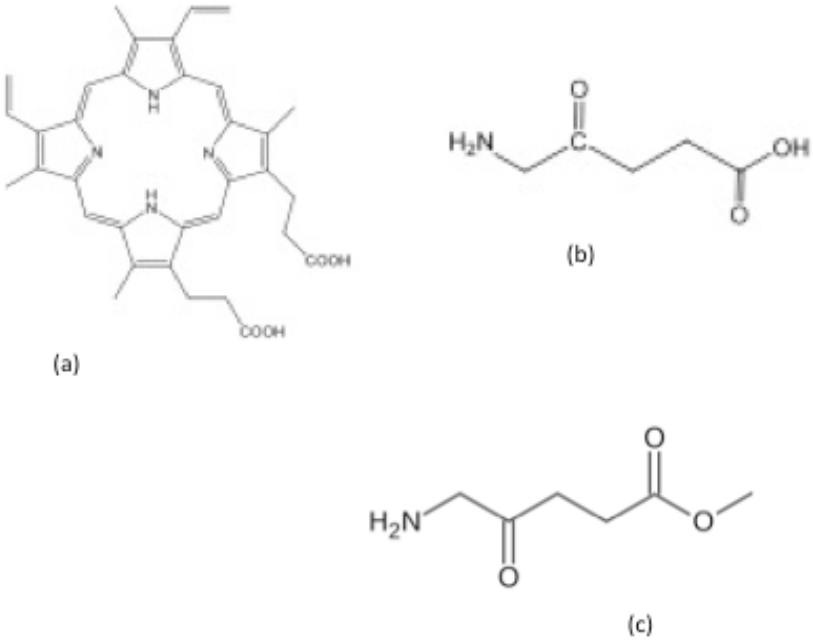


Figure 19 - Structure de la protoporphyrine IX et du 5 AAL

La protoporphyrine IX est un photosensibilisant endogène présent à l'état physiologique au sein de toutes les cellules [113]. Il est un des acteurs intervenant au cours des voies de la biosynthèse de l'hème[114]. Toutes les cellules sont capables de produire de la PpIX en convertissant l'AAL excepté le globule rouge qui ne possède pas de mitochondrie[115]. La biosynthèse de l'hème se produit dans deux compartiments cellulaires différents: la mitochondrie et le cytosol.

L'AAL est produite à partir de la glycine et du succinyl CoA grâce à l'aminolévulinate synthétase (Fig-20). L'ALA déshydratasse catalyse la condensation de 2 molécules d'AAL pour former le porphobilinogène (PBG). Quatre molécules de PBG sont converties en uroporphyrinogène I. Ces réactions aboutissent à la formation de protoporphyrine IX à laquelle un atome de fer est ajouté grâce à la ferrochelatase pour former l'hème[116].

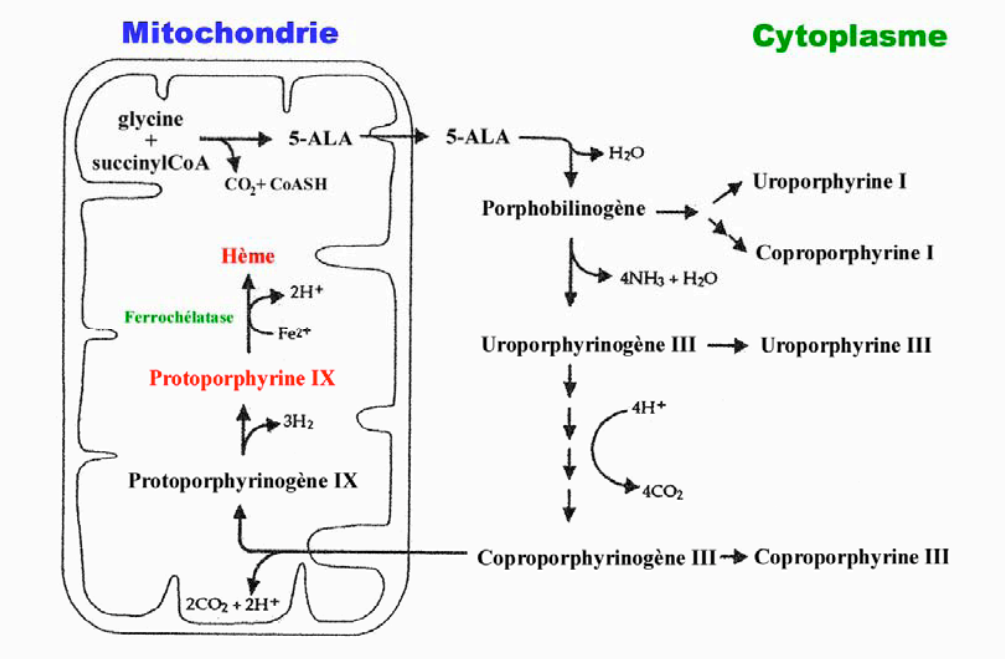


Figure 20 – Schéma de la biosynthèse de l'hème [28]

Ce principe de photosensibilisation endogène est la base du principe de la PTD topique développée de nos jours. L'apport extérieur excessif d'AAL, provoque une accumulation de PpIX sélective au sein de cellules en phase de prolifération, par inhibition du rétrocontrôle négatif de l'ALA synthétase [115]. Par ailleurs, la transformation de PpIX en hème est un processus long favorisant son accumulation. La PpIX se localise essentiellement dans la mitochondrie et la mort cellulaire est liée à une phototoxicité mitochondriale[117]. L'illumination des cellules ayant accumulé le PS aboutit à la destruction tissulaire en générant des espèces réactives de l'oxygène et des espèces oxygénées réactives ou radicaux libres[118].

La PpIX possède un maximum d'absorption à 410 nm et 4 pics de plus faible intensité à 510, 580 et 635 nm[95]. Son coefficient molaire d'extinction est < 5. 10^3 M^{-1} cm^{-1} à 635 nm [119].

β. Comportement de l'Acide δ Amino-lévulinique (AAL)

La PTD topique avec l'AAL est potentiellement la modalité thérapeutique en photothérapie la plus avantageuse[120]. Son utilisation en PTD est né du constat que lorsque l'on administre expérimentalement une dose adéquate d'AAL à des animaux, on observe le développement d'une fluorescence de certains tissus comme la peau, les muqueuses orale, vésicale, urothéliale, bronchique et génitale et pas dans les tissus cardiaque ou squelettique[121,122]. Par ailleurs, l'intensité de la fluorescence est supérieure dans les tissus néoplasiques par rapport aux tissus sains avoisinants[5,120]. La sélectivité de l'AAL dépend de la variabilité cellulaire des taux d'enzymes intervenant dans la biosynthèse de l'hème, de la faible concentration de certaines cellules en fer[123], des dommages du *stratum corneum*, des tissus anormaux et de la perméabilité vasculaire des tissus tumoraux cutanés[124].

L'AAL possède une clairance d'élimination intéressante, puisqu'il disparaît des tissus en moins de 24h quelque soit son mode d'administration (intra-péritonéale, IV, orale ou sous-cutané)[121]. L'AAL par voie intraveineuse est peu utilisé du fait d'effets secondaires systémiques graves : douleur, hypotension artérielle et bradycardie. C'est la forme galénique topique qui est privilégiée. Le temps d'incubation (correspondant à la transformation de AAL en PpIX) entre l'administration de l'AAL et l'illumination varie de 1 à 8h en fonction de son mode d'administration[125]. Plus récemment, l'utilisation de patch d'AAL a démontré une efficacité comparable à son application topique dans le traitement des kératoses actiniques[126]. Cette formulation permettrait de traiter les patients en ambulatoire.

L'AAL est peu lipophile et pénètre par conséquent peu à travers les barrières biologiques particulièrement le *stratum corneum*, riche en lipides. Ce manque de lipophilie nécessite l'utilisation de doses plus importantes de PS, à l'origine de majoration des effets secondaires lors des séances de PTD (douleur, irritation et neurotoxicité)[127,128]. Ce constat est à l'origine du développement de la forme estérifiée[129].

γ. Levulan® Kerastick

La première forme commerciale de l'AAL est le Levulan® Kerastick. Il a obtenu en 2000, l'autorisation d'être utilisé aux Etats-Unis pour le traitement des kératoses actiniques (KA) de la face et du cuir chevelu avec la lampe BLU-U à 10 J/cm^2 en montrant des taux de réponse complète (TRC) variant de 83 à 94% dans des essais de phase III contrôlés et multicentriques sur 243 patients[130,131]. Les taux de récidives à 1 an sont de 19 %[132]. Le Levulan® est appliqué grâce à un stick 14 à 18h avant une illumination avec la lampe BLU-U (417 nm) de 16 min 40 à 10 J/cm^2 (Fig-21).

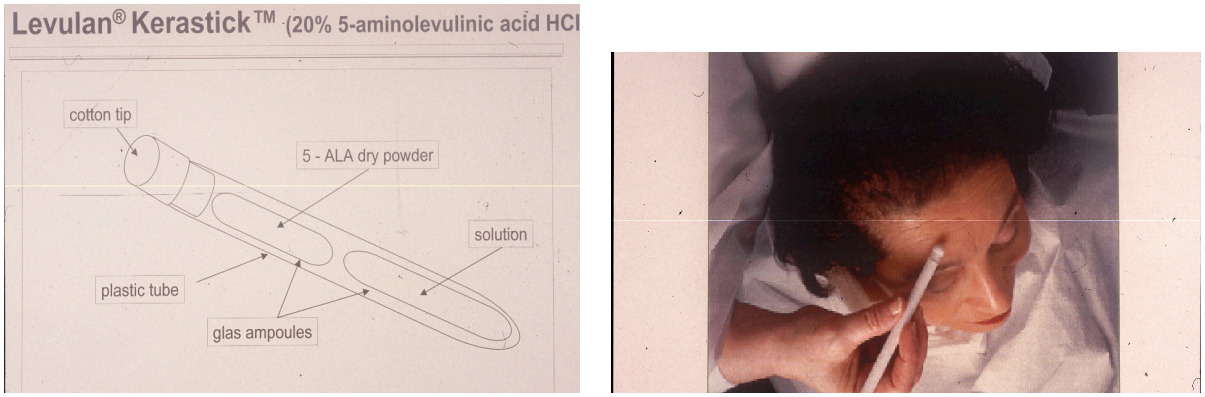


Figure 21 - Procédure d'application du Levulan® Kerastick

Le Levulan® a été utilisé avec succès pour le traitement de nombreuses tumeurs malignes cutanées non mélaniques.

Les premières études avec l'AAL dans le carcinome basocellulaire superficiel (CBCs) ont montré des taux de réponses (TRC) de 90 % après une seule séance de traitement[5]. Les taux de réponses complètes immédiates sont de 100 % dans les kératoses actiniques (KA), les carcinomes basocellulaires superfciels (CBCs), les maladies de Bowen (MB) et les kératoacanthomes et de 80% dans le carcinome basocellulaire nodulaire (CBCn). Les taux se maintenaient dans les études de suivies à 24 et 36 mois pour les kératoacanthomes et les maladies de Bowen et diminuaient à 85 % dans les CBCs et KA[133]. L'adjonction de DMSO ou d'EDTA au Levulan® permettait d'augmenter le rendement de production de PpIX[134]. Morton rapportait 88% de TRC dans les maladies de Bowen[135]. Plus récemment, Clark *et al* rapportaient des taux de réponse de 91-97 % et de taux de récidive de 5 à 10 % à la 48ème semaine dans les KA, MB and CBCs chez 209 patients[86]. Le Levulan® est aussi efficace que le 5 fluorouracile pour le traitement des KA des mains avec de meilleurs résultats

cosmétiques[136]. L'un des principaux inconvénients du produit est sa faible pénétration tissulaire d'ou la recherche d'autres précurseurs estérifiés.

b. Méthyl-aminolévulinate (MAL)

α. Méthyl-aminolévulinate

Le méthyl-aminolévulinate (MAL) (Metvix®, Metvixia®, Hexvix®) est une forme estérifiée de l'AAL (Levulan® Kerastick,). La liposolubilité du photosensibilisant permet d'augmenter l'efficacité de la PTD en facilitant sa pénétration dans le stratum cornéum[137,138]. En effet, le MAL (Metvix®) pénètre à 2 mm de profondeur dans le CBC 3h après avoir été appliqué et 1 mm avec l'AAL[138].

L'estérification permet aussi d'augmenter la formation intracellulaire de protoporphyrine IX (PpIX) au sein de lignées murines mélanocytaires tumorales (B16) et par conséquent de diminuer la concentration du PS nécessaire pour obtenir la destruction cellulaire [139]. Elle permet également une diminution du temps d'application et une biodistribution plus homogène que la forme non estérifiée[140]. Le méthyl-aminolévulinate est déméthylé grâce à des estérases intracellulaires en AAL dans la cellule cible.

Afin d'augmenter la pénétration du PS à travers le *stratum cornéum*, d'autres procédés ont été évalués comme l'utilisation de DMSO, d'EDTA ou des formes liposomales[134,141-143].

β Metvix®- Metvixia®

En 2001, le Metvix® est approuvé en Suède pour le traitement des KA non hyperkératosiques du scalp et de la face et le traitement de CBCs non accessibles aux thérapeutiques conventionnelles. Le Metvix® est aussi efficace que le Levulan® pour le traitement des KA, et entraine moins de douleurs[144]. Les taux de réponses varient de 69 à 91%[145]. Rhodes *et al* rapportaient des résultats cosmétiques supérieurs à la chirurgie de CBCn avec des taux de récidive de 14% dans le groupe PTD *versus* 4% dans le groupe chirurgie[146]. Le Metvix® est plus efficace dans les formes superficielles de CBC que dans les formes nodulaires. Les TRC sont de 89,4% dans les CBCs et de 52,2% dans les CBCn à M1 après 1 cycle de 2 séances[147].

Le Metvixia® (Chlorhydrate d'aminolévulinate de méthyle) a obtenu l'AMM en septembre 2006 en France pour le traitement des KA non hyperkératosiques et non pigmentées du visage et du cuir chevelu, les CBCs non récidivants du tronc. Elle est autorisée aussi pour les

membres chez les sujets immunocompétents après biopsie et les maladies de Bowen non pigmentées si la chirurgie est impossible, elle peut être utilisée chez les sujets immunocompétents après biopsie et contrôle de la guérison. Une séance est préconisée pour les KA et CBCs et 1 cycle de 2 séances séparées d'une semaine pour les MB (Fig-22).

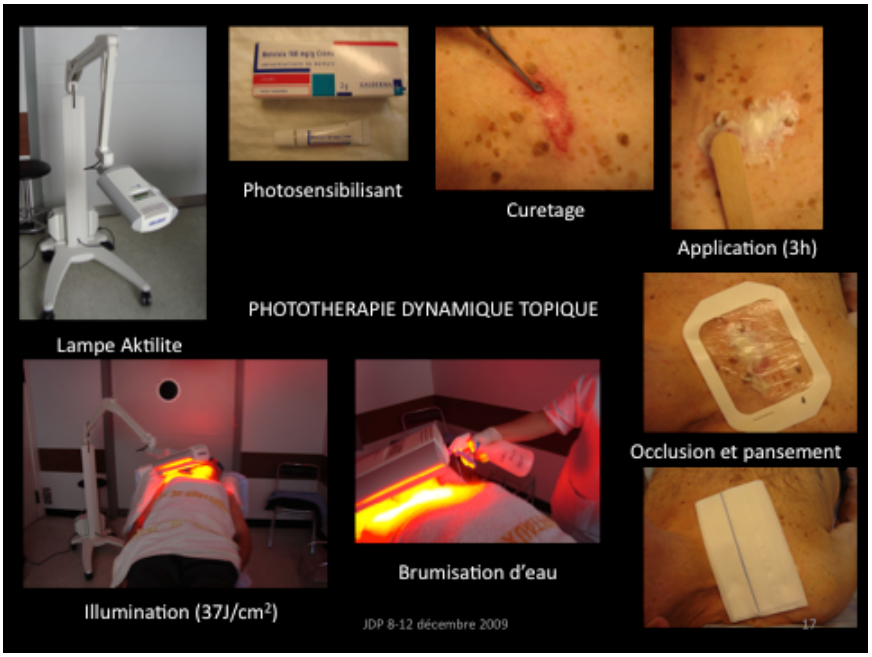


Figure 22 - Procédure de traitement de PDT topique avec le Metvixia®

c. Texaphyrine de lutétium- Lutrin®

Connue sous le nom de Lutrin®, la texaphyrine de lutétium (Lu-Tex) est un photosensibilisant non porphyrinique qui est à présent autorisé en phase II d'essais cliniques pour le traitement de cancers du sein et des mélanomes (Fig-23)[148]. Il possède une spécificité très forte vis-à-vis des tissus tumoraux et une longueur d'onde d'excitation maximale située vers 732 nm[149]. Cette dernière propriété autorise une forte pénétration de la lumière dans les lésions ce qui le différencie des autres photosensibilisateurs.

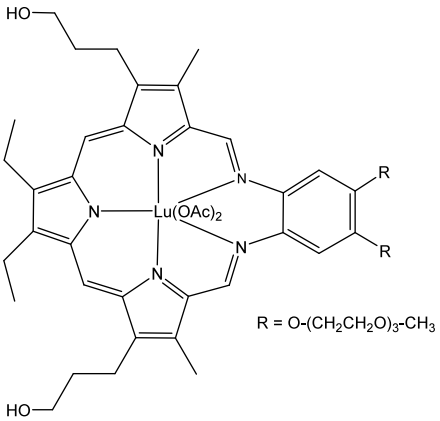


Figure 23 - Structure du texaphyrine de lutétium

Son coefficient d'extinction molaire est 4,2. 10^4 M^{-1} cm^{-1} à 730 nm[119]. Le Lu-Tex est soluble dans l'eau et a un excellent rendement quantique d'oxygène singulet. Sa demi-vie plasmatique après injection IV est courte de 7 h minimisant les phénomènes de photosensibilité rémanente[148]. Sa biodistribution et sa sélectivité sont bonnes et sa cible cellulaire est initialement le lysosome[150]. Le Lu-Tex a été testé avec succès sur des lignées mélanocytaires tumorales murines (B16-F10) avec une meilleure biodistribution du PS traité préalablement par ApoE[150]. Dans le traitement de carcinomes mammaires murins (SMT-F), le Lu-Tex (40 mg/kg, 150 J/cm^2, 740 nm) est plus efficace que le Photofrin® avec des taux de réponse de 100% dans le groupe PTD-LU-TEX versus 67% dans le groupe Photofrin® ; ceci est du probablement au fait de la profondeur de pénétration[151]. Dans une étude de phase I, ce PS a été utilisé chez 16 patients atteints d'un cancer de la prostate en montrant des résultats prometteurs[152,153].

D'autres études ont prouvé qu'il s'agissait d'un PS efficace avec peu de photosensibilité rémanente, une bonne absorbance à 732 nm. Il est soluble dans l'eau, mais l'un des inconvénients rapporté était la douleur lors des séances de PTD[154].

Lors d'étude de phase I, le lutétium a été utilisé à des doses variant de 0,6 à 7,2 mg/kg, et après une incubation de 3 h, l'illumination avait lieu avec des lasers ou des LED de 732 nm et 150 J/cm^2. Des métastases cutanées de cancer du sein (15), 7 mélanomes et 6 sarcomes de Kaposi ont été ainsi traités. Les auteurs ont pu montrer 29% de taux de réponse complète (TRC) et 17% de taux de réponse partielle (TRP). Une réponse complète était observée avec le mélanome.

d. Le méso-tétrahydoxyphénylchlorine (m-THPC) Foscan® Temoporphyn®

Le m-THPC est une chlorine pure et hydrosoluble ceci permet son injection IV (Fig-24). Sa demi-vie plasmatique chez l'homme est 45-65 h. Son coefficient molaire d'extinction est de 3. 10^4 $M^{-1}cm^{-1}$.

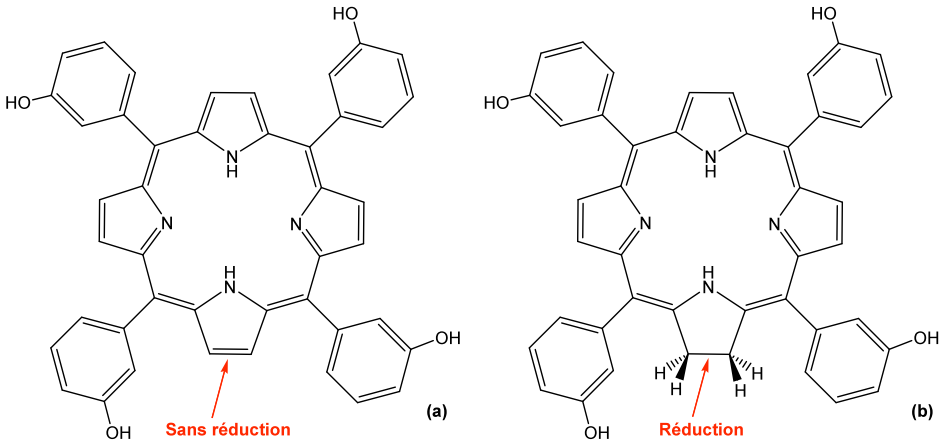


Figure 24 - Structure de la m-THPP (porphyrine) (a) et la m-THPC (chlorine) (b)

La *m*-THPC présente deux bandes principales d'absorption. L'une se situe vers 415 nm et l'autre à 650 nm vers le rouge. L'excitation de ce PS aux différentes longueurs d'onde de son spectre d'absorption lui confère la possibilité d'être utilisé en photodiagnostic grâce à son émission de fluorescence dans le rouge (652 nm). L'existence de bandes intermédiaires et notamment d'une bande à 514 nm n'est pas dénuée d'importance. En effet, ce signal peut être utilisé en clinique dans le cas des cancers de l'œsophage. L'utilisation d'une irradiation vers 514 nm, ne pénétrant pas profondément dans les tissus, permet l'activation de la *m*-THPC tout en préservant l'organe à traiter. Par contre, ce n'est pas le cas pour un traitement avec une lumière d'excitation à 650 nm. Le m-THPC permet la destruction de lésion jusqu'à 1 centimètre de profondeur, lorsqu'il est illuminé avec une lumière rouge de 652nm de longueur d'onde. La m-THPC est 100 fois plus efficace que les PS de première génération. Le mécanisme d'action de la PTD-Foscan® est une toxicité tumorale directe avec dommages vasculaires[155].

La *m*-THPC fait actuellement l'objet d'essais cliniques pour le traitement des tumeurs des voies aérodigestives supérieures, de l'œsophage, des bronches et de l'estomac. Elle présente de nombreux avantages :

- une grande pureté,
- un fort coefficient d'absorption dans le rouge,

- une photocytotoxicité élevée,
- un rendement quantique important.

Les résultats de la littérature font apparaître que cette structure induit une nécrose tumorale à des doses pour lesquelles les porphyrines seraient inefficaces. Cela permet d'utiliser des doses faibles en PS et donc de réduire les risques de photosensibilisation suite à son administration.
Le Foscan® est utilisé depuis 2002 pour le traitement palliatif des cancers ORL[156]. Les doses utilisées sont peu élevées (0,1 mg/kg) et injectées en IV. L'activation de m-THPC nécessite une faible intensité lumineuse de l'ordre de 10 J/cm^2. Les doses de PS et l'intensité lumineuse sont 100 fois moins importantes qu'avec le Photofrin® pour obtenir une efficacité supérieure à ce dernier[157].
Dans des essais de phase I/II, le Foscan® a permis d'obtenir 86% de TRC à 12 mois pour le traitement des CBCs après PTD systémique[158]. Les patients sont photosensibles pendant 1 semaine et doivent se protéger du soleil pendant 2 semaines.

e. Le méso-tétraphénylporphynesulfonate tétrasodium (m-TPPS)

Il s'agit d'un PS hydrosoluble grâce à sa fonction sulfonate. Il possède un bon rendement quantique d'oxygène singulet[159]. Sa cible cellulaire est le lysosome. Le traitement de 23 CBCs, 8 MB, 1 CSC 1 métastase cutanée de cancer mammaire par PTD topique, en illuminant avec un laser Argon (630 nm) permettait d'obtenir 25 RC[160]. Ce PS a été progressivement abandonné en clinique humaine du fait de la neurotoxicité lors des injections intra-péritonéales[161]. La forme liposomée a été développée pour rendre la molécule lipophile et permettre ainsi son incorporation membranaire [162,163].

f. Benzoporphyrine, Visudyne®

La Visudyne® est une chlorine hydrophobe chimiquement stable, présentant une bande d'absorption à 692 nm, et elle possède un bon rendement de formation d'états triplets[164] (Fig-25). Elle présente une accumulation rapide dans les tissus tumoraux permettant une irradiation au bout de 30 à 150 minutes. Elle est rapidement éliminée (par voie hépatique en 24 heures) et la photosensibilité de la peau ne dure que quelques jours. La Visudyne® (vertéporfine) est utilisée pour le traitement de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) depuis 2000. Après l'injection IV de 6mg/m^2 de Visudyne®, le PS se fixe sélectivement sur les cellules

endothéliales et est activé par un laser 15min après, à 689 nm à 50J/cm[2165]. Les patients ont une photosensibilité et une phototoxicité oculaire durant 2 jours après le traitement[166]. La BPD-MA (**b**enzo**p**orphyrin **d**érivative **m**onoacid ring **A**) va agir en détruisant sélectivement les cellules endothéliales des néocapillaires choroïdiens[167]. Pour les patients atteints de la forme la plus grave de DMLA, la Visudyne® diminue de moitié le risque de perte de la vision sur une période de deux ans. L'effet est notable pendant au moins trois ou quatre ans. Le traitement fonctionne également dans des formes moins graves de DMLA et dans le cas de la myopie pathologique, avec des résultats cependant moins significatifs. Seule une petite partie des patients souffre de coups de soleil ou de réactions secondaires.

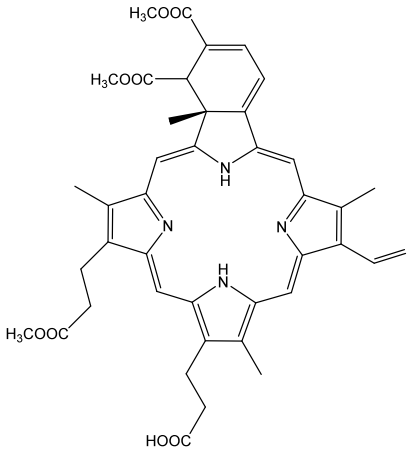


Figure 25- Structure de la Visudyne®

La Visudyne® est administrée sous forme de liposomes. Ce type d'incorporation confère à ces derniers un rôle de vecteur pharmacologique permettant une certaine protection du PS contre les mécanismes enzymatiques de dégradation. Ce vecteur permet également de créer des complexes avec d'autres structures lipophiles telles que le LDL (Low Density Lipoproteins) présents dans le sérum. La présence de nombreux récepteurs aux LDL au niveau des néovaisseaux pourrait expliquer la sélectivité de la Visudyne® pour les vaisseaux choroïdiens.

g. Etiopurpurine d'étain ($SnET_2$) Purlytin®

L'étiopurpurine d'étain, Purlytin®, est un PS de la famille des chlorines[168] (Fig-26). C'est une molécule conjuguée possédant un atome d'étain au centre de la structure et ayant une longueur d'onde d'absorption aux alentours de 650 nm (à 664 nm). Son coefficient molaire d'extinction est de 2,8. 10^4 M^{-1} cm^{-1}[1119]. La PTD induite par cette molécule affecte les mitochondries et provoque rapidement une réponse apoptotique. La fragmentation de la

chromatine et la formation des corps apoptotiques sont observées soixante minutes après le traitement photodynamique[100].

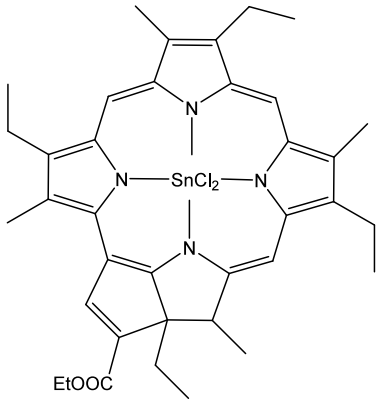


Figure 26 - Structure moléculaire de l'étiopurpurine d'étain

Après injection, l'étiopurpurine d'étain se localise dans la peau et peut provoquer une photoréaction pendant 7 à 14 jours[168,169]. Il a été évalué pour le traitement du cancer métastasique du sein, les carcinomes basocellulaires et les sarcomes de Kaposi des VIH. De plus, il est en cours d'évaluation pour la photothérapie de la néovascularisation cornéenne[169,170].

De multiples CBC chez un patient atteint d'une naevomatose basocellulaire ont été traités avec succès avec le Purlytin®[171]. Il est efficace pour le traitement palliatif de métastases cutanées d'adénocarcinome[172].

Le Purlytin® possède comme avantage par rapport au Photofrin® de pénétrer plus profondément au sein des tissus cibles. Toutefois, son insolubilité dans l'eau nécessite des formulations spécifiques dans des substances lipidiques (Cremophor-EL émulsion, LDL) en augmentant leur toxicité à l'obscurité.

h. Mono-L-aspartylchlorine e6-Npe6

La mono-L-aspartylchlorine e6 (Fig-27) est une chlorine, dérivée de la chlorophylle, désignée sous le nom de Npe6. Son maximum d'absorption est à 664 nm et son coefficient d'extinction molaire est 4.10^4 M^{-1} cm^{-1}[173]. Sa bonne solubilité lui est conférée par la présence du résidu aspartate. Son maximum d'efficacité est obtenu 2-4 h après injection IV[174]. Son mécanisme d'action repose sur une toxicité directe sur les vaisseaux, avec agrégation plaquettaire et thrombose[175]. Des études pharmacocinétiques ont démontré que le NPe6 se lie à 63% à l'albumine, 31% à HDL et 1-2% à LDL. Sa cible cellulaire est le lysosome. De plus, elle est

capable d'induire l'expression de VEGF et de certains proto-oncogènes *c-jun* et *c-fos* dans des lignées cellulaires humaines de carcinomes ORL[176]. Sa demie-vie varie de 9 à 134 h après injection IV de 0,5-3,5 mg/kg selon les études[177].

Les premières études ont été réalisées sur des modèles de sarcome murin (EMT-6) et ont montré des taux de réponse prometteurs avec des doses de 8 mg/kg IV avec peu d'effets secondaires[178]. Les études de phase I ont permis de montrer que le NPe6 à 2,5 mg/kg IV permettait d'obtenir des taux de réponse de 66% dans le traitement de tumeurs malignes sous cutanées. Utilisée à faibles doses, la Npe6 peut induire la régression provisoire des tumeurs. A forte dose, la régression est prolongée, mais la sélectivité vis-à-vis des tissus néoplasiques est diminuée[179].

Les études de phase II montrent 84% de réponse complète chez les patients atteints de carcinomes épidermoïdes à des stades précoces[180]. Ce photosensibilisant a été utilisé pour le traitement d'hépatocarcinome et de métastases hépatiques de cancer colo-rectal avec des résultats encourageants[181].

Elle est étudiée pour le traitement de l'adénocarcinome du sein, les carcinomes basocellulaires et épidermoïdes. Ce PS de seconde génération a été approuvé au Japon pour le traitement des stades précoces et donc localisés des cancers pulmonaires. Elle est éliminée rapidement des tissus ; par conséquent l'irradiation est réalisée dans les quatre heures suivant l'injection[137]. Ce composé entraîne une faible photosensibilité de la peau du fait d'une clairance d'élimination rapide. Il est en cours d'essais afin de détruire les néovascularisations de la rétine. Les résultats préliminaires révèlent que la Npe6 détruit efficacement les vaisseaux choroïdiens en produisant peu de dommages à la rétine.

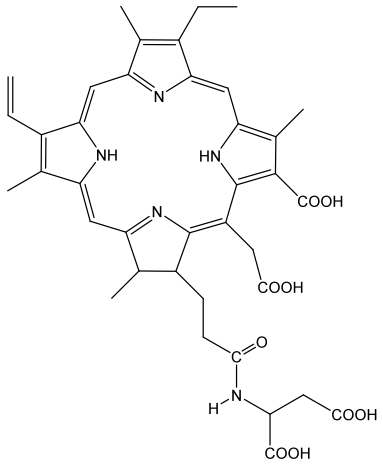


Figure 27 - Structure de la mono-L-aspartylchlorine

La NPe6 représente un PS prometteur pour le traitement de nombreux cancers avec une efficacité prouvée et une faible photosensibilité rémanente du fait d'une clairance rapide d'élimination par de nombreuses études. La NPe6 en application topique a démontré une excellente pénétration en profondeur et une pénétration rapide chez la souris[182].

i. Les Phthalocyanines

Les phthalocyanines (Pc) présentent une forte absorption entre 670 et 770 nm avec maximum d'absorption à 765 nm dans le rouge[183] (Fig-28). Son coefficient d'extinction est $2{,}5.10^5$ M^{-1} cm^{-1}. Le temps d'incubation est court et de 1h. Elles ont de multiples avantages : une faible cytotoxicité à l'obscurité, une photosensibilisation cutanée diminuée grâce à une clairance rapide de ces composés, une rétention tumorale sélective, et enfin, une photocytotoxicité très intéressante.

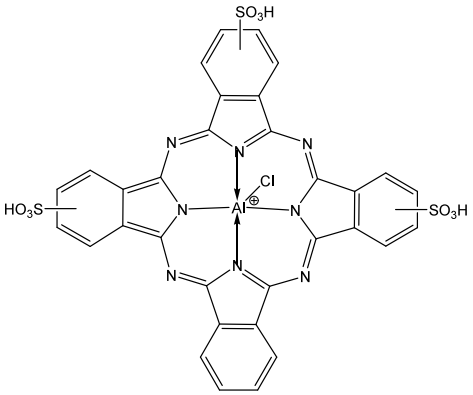


Figure 28- Structure de la chloroaluminium phthalocyanine sulphonée.

L'activité des phthalocyanines dépend de leur localisation cellulaire en fonction de leur caractère hydrophile ou lipophile[184]. Elles peuvent être métallées par de nombreux ions comme l'aluminium ou le zinc qui augmentent leur photocytotoxicité[111]. La plus connue et la plus utilisée des phthalocyanines est la chloroaluminium phthalocyanine sulfonée (ClAlPcS ; Fig-28). Elle est soluble dans l'eau, sa durée de rétention dans le tissu tumoral étant élevée. Les études avec cette molécule ont été uniquement menées *in vitro* et *in vivo* chez l'animal[185]. Elle s'accumule dans les mitochondries et est transporté par des protéines plasmatiques, des lipoprotéines et l'albumine[186]. Les conséquences majeures d'un traitement PTD avec cette substance sont des dommages vasculaires au niveau de la tumeur.

Le Pc 4 a été utilisé avec succès sur des modèles de rat immunodéprimé atteint de gliomes humains (U87)[187]. Des essais de phase I ont été réalisés avec ce PS dans le traitement de mycosis fungoïde et ont montré des résultats encourageants sans toxicité locale ou systémique[188].

j. Les porphycènes

Le porphycène a un maximum d'absorption à 640 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 5.10^4 M^{-1} cm^{-1} (Fig-29)[189]. Après illumination, le porphycène est capable de produire des espèces réactives de l'oxygène au sein du tissu cible[190]. Une forme plus hydrophobe, tétra-n-propyl-porphycène, a été développée, mais son temps de biodistribution est long de l'ordre de 16 h après une administration IV. Une forme plus hydrophile a permis d'accroître sa rapidité de biodistribution et sa sélectivité[191]. Il existe plusieurs types de porphycènes dont la localisation cellulaire est variable au sein de différents types de cellules: monomère de porphycène dans la mitochondrie ou le lysosome pour 9-acétoxy-2, 7, 12, 17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycène (ATMPn)[190,192,193]. Elles sont à l'origine de dégâts vasculaires[108]. Elles ont une clairance d'élimination rapide et donc peu de photosensibilité rémanente. Elles sont capables de déclencher des phénomènes apoptotiques et nécrotiques prometteurs pour des applications cliniques.

Figure 29- Struture de la porphycène ferrique

k. Bactériophérophorbide pallidium-Tookad®

Le pallidium de bactériophérophorbide (WST09) a un coefficient d'extinction molaire de $10,86.10^4$ M^{-1} cm^{-1} et un pic d'absorption maximale dans l'infrarouge (IR) à 763 nm (Fig-30). Cette longueur d'onde permet une pénétration tissulaire de plus de 4mm (par rapport au Photofrin® à 1,6 mm à 630 nm).

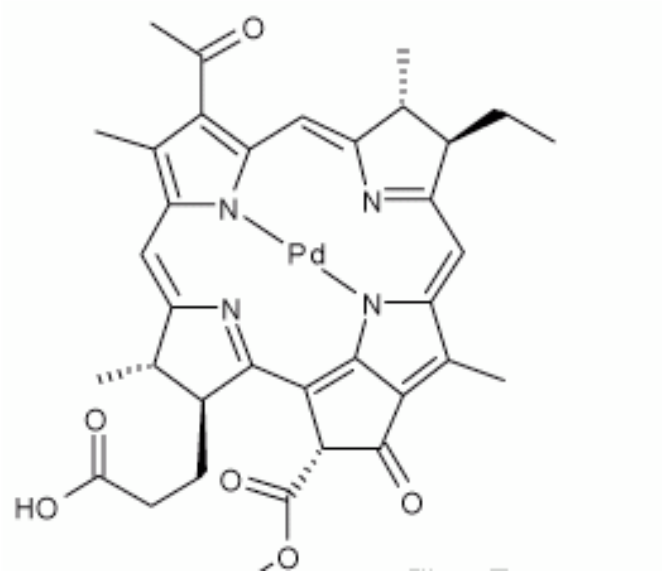


Figure 30- Bactériophérophorbide pallidium

Le produit s'accumule en 15 min dans le tissu cible après son administration IV avec une demie-vie plasmatique de 20 min[194]. Son principal avantage est son court délai entre l'administration du PS et l'illumination. Son mécanisme d'action cible la néovascularisation avec des processus d'inflammation, d'hypoxie et de nécrose[195]. Les études expérimentales ont démontré l'efficacité de WST09 dans les modèles canins de cancers humains prostatiques avec 69% de TR et la disparition des métastases dans 50% des cas[195]. Au cours des essais cliniques, on observe que plus de 50% de patients atteints de cancers prostatiques en échec de radiothérapie obtiennent des RC après l'administration IV de 2 mg/kg de WST09[196].

4.4 Les photosensibilisants de troisième génération

Les photosensibilisants de troisième génération sont actuellement en voie de développement. Ils reposent sur le même principe que ceux précédemment décrits, mais la molécule est liée à

un vecteur reconnu spécifiquement par des cellules cancéreuses. Ces ligands spécifiques peuvent être par exemple des stéroïdes, des aminoacides ou des carbohydrates. Parmi cette nouvelle classe de PS, on note le complexe porphyrine-estradiol[197] (Fig-31).

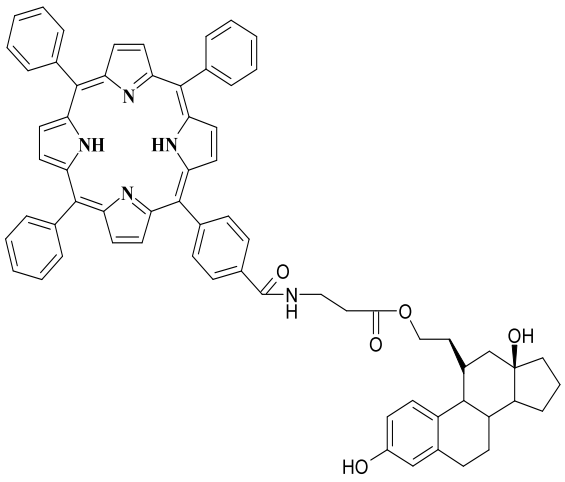


Figure 31 - Structure du complexe porphrine-estradiol

En effet, ce noyau de type tétraphenylporphyrine, relié à l'estradiol par l'intermédiaire d'un bras espaceur, est reconnu spécifiquement par les récepteurs de l'œstrogène, surexprimés par des cellules tumorales de certains cancers (cerveau, sein, ovaire). Toutefois, les études restent à ce jour limitées, et d'autres types de PS (de type chlorine) sont à l'étude.

De même, le complexe acide folique-carboxyphenylporphyrine cible les récepteurs de l'acide folique, surexprimés à la surface de nombreuses cellules cancéreuses (cancer du cerveau, du poumon...)[198] (Fig-32). Cette molécule possède une plus forte activité photodynamique que la porphyrine sans l'acide folique.

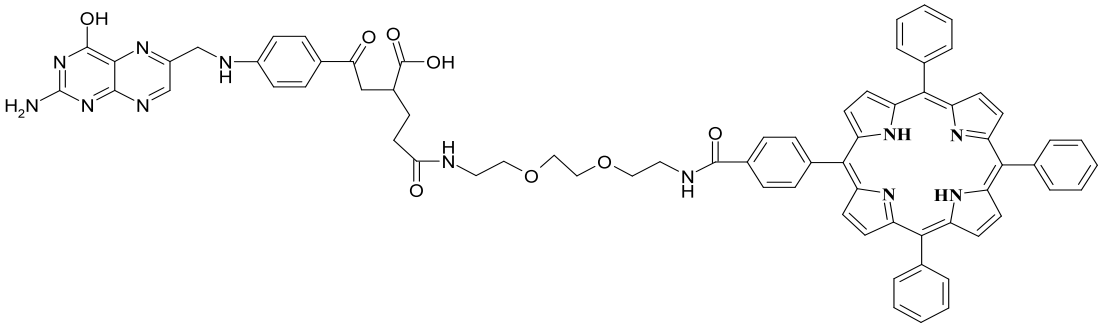


Figure 32 - Structure du complexe porphyrine-acide folique

Parmi les autres vecteurs spécifiques couplés aux PS, les unités osidiques ont fait l'objet d'un nombre important de travaux. En effet, les membranes cellulaires contiennent diverses protéines, parmi lesquelles des récepteurs de la classe des lectines, qui sont capables de reconnaître spécifiquement les résidus glycosidiques[199].

Ce sont des macrocycles tétrapyrroliques portant des unités glycosylées, qui sont susceptibles d'être reconnues spécifiquement par des récepteurs présents à la surface des cellules tumorales. En effet, la présence d'unités glucidiques permet d'augmenter la biodisponibilité du PS, mais favorise son élimination après le traitement. Le caractère amphiphile du PS est augmenté par ces unités osidiques favorisant la pénétration du principe actif dans les membranes. L'hydrophilie du photosensibilisateur peut ainsi être contrôlée par le nombre, la position et le type de saccharides fixés[200].

Ainsi plusieurs générations de macrocycles tétrapyrroliques (porphyrines ou chlorines) glycosylés se sont succédées.

Parmi ces complexes, le LCSN a réalisé la synthèse de plusieurs porphyrines glycosylées (Fig-33) tels que des arylporphyrines cationiques, neutres substituées par des mono et des disacharrides. De plus, des dérivés d'hématoporphyrine et d'arylporphyrines porteurs d'unités glucidiques liés au macrocycle par une liaison thioether ont été obtenus ceci pour limiter l'action des glycosidases endogènes[201-203].

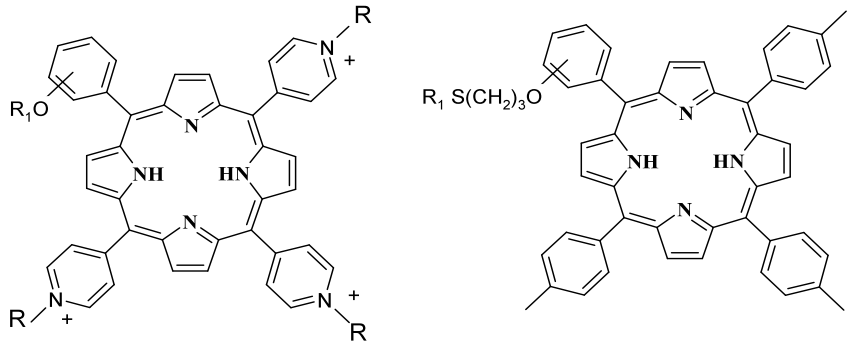
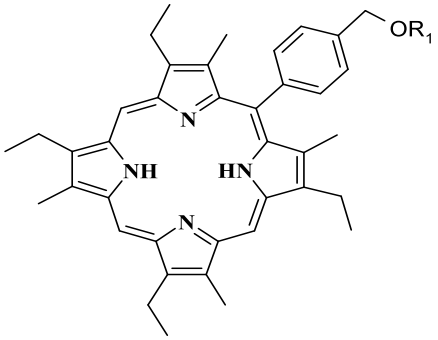


Figure 33 - Exemples d'arylporphyrines cationiques *O*-glycosylées et neutres *S*-glycosylées

Par ailleurs, Hombrecher et *al* ont realisé la synthèse d'un certain nombre de dérivés de monoarylporphyrines monoglucosylées possédant des substituants sur les positions β

pyrroliques (Fig-34)[204]. Ils ont ainsi étudié, en variant la nature de l'unité osidique, l'interaction de ces composés avec des modèles de membranes cellulaires



avec R_1 = GlucOH, GalOH, ManOH, MaltOH, LactOH

Figure 34- Exemples de monoarylporphyrines monoglycosylées

En ce qui concerne les chlorines, Pandey et *al* ont montré que des dérivés de chlorine portant une unité galactose (Fig-35) séparée du macrocycle par un bras espaceur avaient une très forte affinité pour les galectines[205].

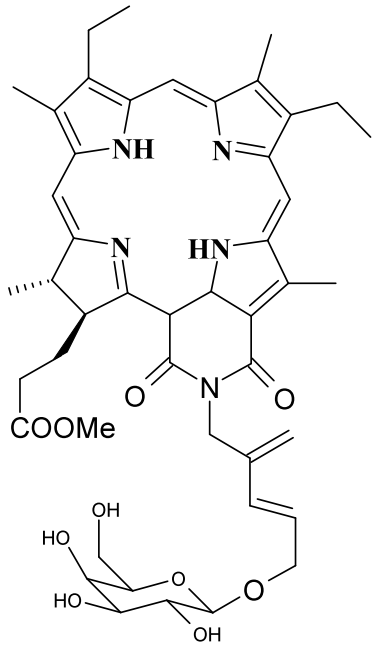


Figure 35 - Chlorine – β-galactose

Ces composés présentent aussi une forte activité photodynamique. De même Maillard et *al* ont développé une nouvelle classe de PS (Fig-36) capable de cibler spécifiquement *in vitro* les lectines surexprimées sur les cellules du rétinoblastome[206,207].

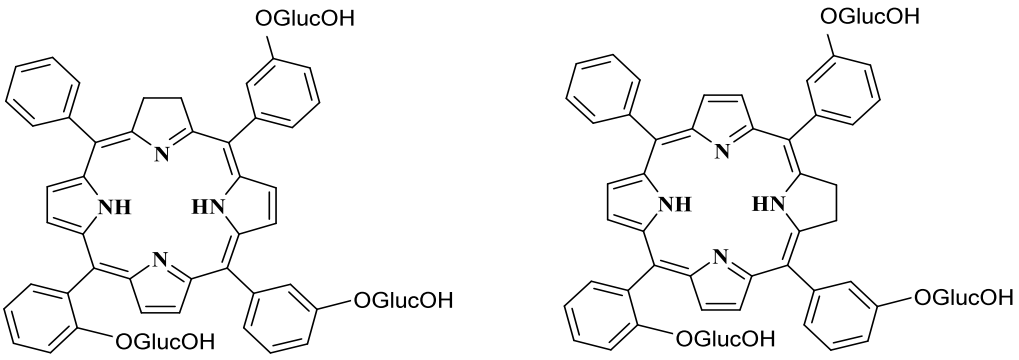


Figure 36 - Structure de deux chlorines triglucosylées

L'équipe de Guillemin a également réalisée la synthèse d'arylporphyrine et de chlorines glucosylées par une ou deux unités de la 2-aminoglucosamine acétylée (Fig-37) [208].

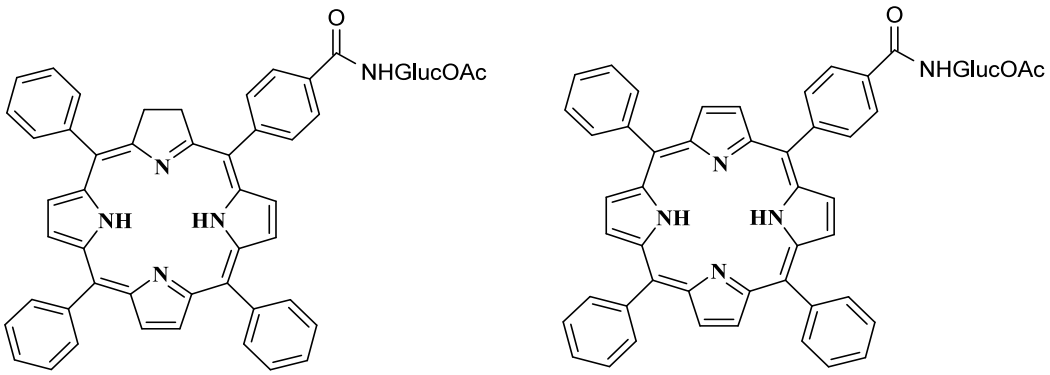


Figure 37- Structure d'une chlorine et une porphyrine portant une unité 2-aminoglucosamine acétylée

Les essais biologiques de ces composés non déprotégés, réalisées sur la lignée cellulaire cancéreuse HT29 ont montré que la chlorine mono 2-aminoglucosylée présentait la plus grande activité photodynamique. Par la microscopie confocale, on a déterminé qu'il s'acumulait dans le reticulum endoplasmique.

Les molécules actuelles utilisées pour le traitement des cellules néoplasiques provoquent d'importants effets secondaires en raison de la toxicité des agents anticancéreux vis-à-vis des

tissus sains. Ce phénomène entraîne ainsi une perte d'efficacité de la molécule en raison de sa faible distribution pour les cellules tumorales. Le LCSN développe depuis plusieurs années des composés plus sélectifs constitués d'un principe actif constitué par le PS (porphyrines, chlorines, benzoporphyrines) et d'une molécule d'adressage spécifique vis-à-vis de récepteurs présents à la surface des cellules malades.

Plusieurs agents de ciblages ont été fixés sur les sensibilisateurs : les unités osidiques, des peptides RGD, des polyamines… Les unités osidiques sont reconnues par des glycoproteines membranaires (lectines) surexprimées à la surface de certaines cellules cancéreuses[209]. Les peptides de type RGD sont capables de reconnaître les intégrines (type $\alpha_V\beta_3$) des cellules endothéliales de la néo-vascularisation tumorale[210].

Les polyamines type spermine ou spermidine sont indispensables à la division cellulaire. De plus, les cellules tumorales qui se multiplient, possèdent un système de transport des polyamines exogènes[211].

Les travaux du LCSN se sont orientés vers l'élaboration de nouveaux PS vectorisés grâce à des molécules spécifiques afin de cibler spécifiquement les tissus cancéreux ou leurs néo-vascularisations. Cette stratégie pourrait également permettre de développer une nouvelle application de la photothérapie dynamique pour la lutte antibactérienne.

Certains PS de seconde génération ont été conjugués à des anticorps monoclonaux (mABs), des liposomes ou des polymères (PEG, polyéthylèneglycol) afin d'augmenter leur sélectivité sur certains tissus tumoraux[212]. L'utilisation de nanoparticules a été évaluée et a montré une augmentation de l'efficacité de PTD[213].

4.5 Les photosensibilisants non porphyriniques

Les PS non porphyriniques sont utilisés en photothérapie dynamique, mais peu sont employés en dermatologie. L'hypericin® (naphtodianthrone) est un PS non porphyrinique avec un maximum d'absorption à 590 nm (Fig-38). Son coefficient d'extinction est $4{,}5.10^4$ M^{-1} cm^{-1}. Administré par voie intralésionnelle, il a permis la rémission complète de CBC et CSC[214].

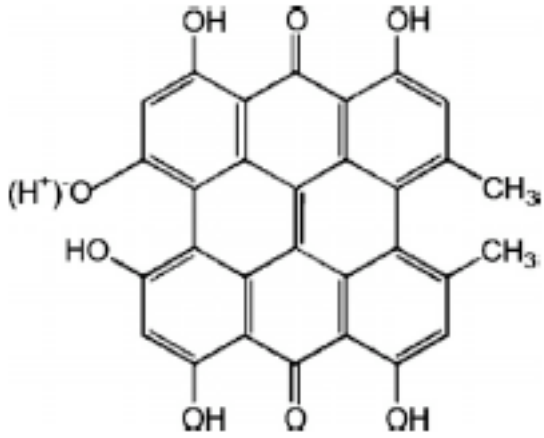


Figure 38- Structure chimique de l'hypericin [81]

L'hypericin® est capable d'engendrer après illumination dans des mélanocytes tumoraux humains un phénomène d'autophagie[81]. L'application topique a aussi été couronnée de succès dans le traitement des CBC, MB et KA dans une récente étude pilote[215]. D'autres substances ont été testés avec des résultats variables, mais sans application en dermato-cancérologie : chalcogenopyrilium, phénothiazine (bleu de toluidine ou de méthylène), les cyanines, et le tétra-acyldipyrrométhène…

C- La Photothérapie dynamique en cancérologie

L'indication pour laquelle la PTD a été initialement développée est la destruction locale de tumeurs solides ou leur photodétection. Cette nouvelle technique non invasive offre des perspectives intéressantes dans le traitement palliatif de cancers[216]. Elle permet la réduction du volume tumoral avant la chirurgie limitant les mutilations. Elle peut permettre le traitement prophylactique de lésions dysplasiques dont les limites d'exérèse sont souvent floues. Il s'agissait pour la plupart des essais de la PTD systémique avec du Photofrin® (2 mg/kg IV, illumination après 48h, à 630 nm avec des endoscopes).

La première tumeur traitée avec Photofrin® en PTD a été une tumeur papillaire de la vessie avant une résection transuréthrale, montrant un taux de récidive de 39% à un an dans le groupe de patients traités par PTD, versus 81% dans le groupe contrôle[217]. Cette étude lui permet d'obtenir l'autorisation de mise sur le marché (AMM) au Canada. La PTD topique avec l'hexo-aminolévulinate, dans les cancers urothéliaux a été utilisée avec succès, après des essais *in vitro* montrant une excellente sélectivité sur l'urothélium[218]. Il peut être employé pour le photodiagnostic lors des cystoscopies.

La PTD est plus efficace que le laser Nd-Yag ou la radiothérapie pour le traitement des stades avancés de cancers pulmonaires non à petites cellules [219]. Elle montre des taux de réponse complète de 98% à 12 -18 mois dans les stades précoces (< 2cm) des cancers pulmonaires avec des taux de survie globale de l'ordre de 50 à 68%[220,221]. La PTD systémique représente un outil efficace dans l'arsenal du traitement palliatif du cancer pulmonaire endobronchique, lorsqu'il obstrue les voies aériennes supérieures, et également pour le traitement curatif des formes microinvasives et des formes *in situ*[222,223]. La PTD systémique avec le Photofrin® est alors efficace dans les stades précoces avec des TRC de 72%[224]. D'autres PS ont été utilisés pour le traitement de cancer endobronchique : m-THPC et une isoforme pégylée[225] avec de bons résultats. D'autres PS en PDT systémique vont être utilisés sans développements commerciaux, à l'inverse des chlorines, le NPe6 approuvé au Japon pour le traitement des cancers pulmonaires[180].

Les cancers de l'oesophage et les œsophages de Barrett sont traités avec succès par la PTD[226]. Les premiers essais de traitement par PTD de cancer oesophagien ont été réalisés sur des stades avancés de la maladie pour des traitements palliatifs[3]. La PTD systémique avec le Photofrin® permettait alors de diminuer la dysphagie[4] provoquée par l'obstruction tumorale oesophagienne chez 91% des patients traité. Ainsi, on a pu contrôler les saignement chez 6 patients sur 77 atteints de cancer oesophagien à un stade avancé[222]. La PTD systémique avec le Photofrin® pour l'œsophage de Barrett est un puissant traitement endoscopique, capable de détruire les dysplasies de haut grade et d'éliminer le risque de développer un cancer oesophagien. La présence d'un œsophage de Barrett multiplie en effet par 30 à 125 fois le risque de développer un cancer oesophagien par rapport à une population normale [227]. Le traitement de l'œsophage de Barrett est l'oesophagectomie. Cette procédure chirurgicale lourde est associée à un taux de complications de 40 à 50% et un taux de mortalité de 3-5%. C'est pourquoi, la PTD offre une alternative non chirurgicale efficace pour éliminer les zones dysplasiques[228].

Biel *et al* rapportent d'excellents résultats de la PTD dans les cancers ORL (Oto-rhino-laryngologiques) inopérables ou en récidive[229]. Hopper *et al* vont utiliser un PS de seconde génération, le m-THPS (Foscan®) pour le traitement des cancers ORL avec succès[156].

---

[3] un traitement palliatif, incapable de guérir, peut obtenir une rémission prolongée de bonne qualité, compatible pendant de nombreuses années avec une vie presque normale.

[4] Douleur lors de la déglutition

La PTD interstitielle permet de réaliser le traitement photodynamique d'organe. La lumière est alors amenée au contact du tissu tumoral à l'aide de fibres insérées dans des aiguilles par voie per cutanée sous contrôle scanographique. Ce type de PTD est utilisé dans le traitement de tumeurs malignes cérébrales. La médiane de survie globale des patients atteints d'astrocytomes malins ou de glioblastomes est améliorée chez les patients traités par PTD[230-232]. La médiane de survie est améliorée avec la AAL-PDT dans les gliomes non reséquables[233]. Les puissances peuvent être plus faibles et la répétition des séances permet d'obtenir des efficacités comparables[234].

Par ailleurs, la PTD s'est avérée efficace dans le traitement des carcinoses péritonéales[235,236]. L'injection intra-péritonéale d'hexaminolévulinate, forme estérifiée d'AAL, à des rats avec des tumeurs ovariennes montrait une nécrose après illumination avec une lumière rouge[237].

Le Photosan®, composé proche du Photofrin® est efficace dans le traitement de cholangiocarcinome non réséquable[238].

La PTD a été utilisée avec succès dans le traitement des cancers de la prostate au stade avancé ou à des stades plus précoces[239,240]. La PTD interstitielle avec le motexafin lutétium permettait le traitement de cancer de la prostate avec une bonne efficacité[218]. De plus, dans les stades précoces du cancer de la prostate, la régression du taux de PSA (prostate specific antigen) est obtenu dans 67% des cas en utilisant du m-THPC et la PTD interstitielle[241].

Les études précliniques ont montré que la PTD avec le Photofrin® ou le phthalocyanine d'aluminium était efficace sur les tissus pancréatiques tumoraux[237]. La PTD topique à visée photodiagnostique a été utilisée pour diminuer les taux de récidives en permettant de délimiter parfaitement les marges tumorales[26,242,243].

D-La Photothérapie dynamique systémique en onco-dermatologie

C'est parce que la peau est aisément accessible à la lumière que les tumeurs malignes cutanées superficielles sont d'excellentes cibles pour la PTD. Des tumeurs malignes non mélaniques ont été traitées avec succès par PTD systémique [244]. Son efficacité a été démontrée dans le traitement de CBC et des métastases cutanées de cancers mammaires[12,245]. Dougherty obtenait une RC ou une RP pour 11 tumeurs malignes cutanées ou sous cutanées sur 113 traitées par PTD-Photofrin® et 100% de TR à 5 mois pour 5 CBC[246].

La plupart des applications cliniques de la PTD en dermato-cancérologie, utilisent la lumière rouge pour le traitement des tumeurs car la pénétration tissulaire est meilleure à ces longueurs

d'onde (625-640 nm). Cependant, Bandieramonte *et al* démontraient qu'il n'existait pas de différence d'efficacité entre la lumière bleue et la lumière rouge lors du traitement par PTD de CBC et de métastases cutanées de cancer du sein de < 4 mm d'épaisseur[247]. L'absorption de la lumière par l'HpD est 1,5 à 3,5 fois supérieure avec la lumière bleue et verte par rapport à la lumière rouge. Cela permet de diminuer le temps d'illumination et les doses de PS, donc de diminuer la photosensibilité prolongée après les séances. Dans une étude prospective, Wilson *et al* rapportaient 88% de RC et 18% de taux de récidives avec 29 mois de suivi chez 37 patients atteints de 151 CBC de la face (dont 50% de CBCs) traités par 1 séance de PTD systémique avec le Photofrin® (1 mg/kg IV, 630 nm, 72-288 J/cm^2)[248]. L'association de la PTD sur le lit tumoral après une chirurgie avec le Photofrin® ou la PTD seule permettait 10 RC sur 12 tumeurs malignes de la tête et du cou[249]. Les taux de réponses complètes pondérés étaient de 86% pour les CBC, 72% pour les CSC et 100% pour les MB[3]. Malgré ces excellents résultats avec la PTD systémique utilisant le Photofrin®, ce PS a été peu à peu abandonné compte tenu d'une photosensibilité rémanente prolongée de 5 à 23 semaines[250,251].

La PTD systémique avec le Photofrin®, à la dose de 1mg/kg avec une énergie d'illumination de 200 J/cm^2 à 630nm en lumière rouge, permettait d'obtenir des TRC de 92% et des taux de récidives de 9% à 4 ans chez les patients ayant des CBC[252]. D'autres études montraient des TRC moyens de 85% dans les CBCs et les CBCn. Les formes sclérodermiformes et pigmentées répondaient moins bien à la PTD[250,253].

Le Photosan® à doses variables de 1,5-3 mg/kg en IV, avec des puissances d'illumination et des temps d'incubation variables, on obtient 5 RC pour les CBC, 1 RC chez une érythroplasie de Queyrat, mais pas d'efficacité sur des métastases de mélanome[254].

Au cours d'une étude prospective, 18 patients atteints de 97 CBC et CSC étaient traités par PTD avec le Foscan® à 0,15 mg/kg IV 96h avant une illumination avec un laser Argon à 652 nm et 5-20 J/cm^2. Kubler et al obtenaient 92,7% de RC avec un suivi moyen de 15 mois[255]. Baas *et al* notaient avec le même PS 86% de RC en fractionnant l'illumination chez 5 patients et 187 CBCs[158]. La photosensibilité rémanente s'observait jusqu'à 3 semaines après le traitement. Le Foscan® à faibles doses 0,05 mg/kg IV, avec une illumination 48 h après à 50 J/cm^2 permettait d'obtenir 96,7% de RC chez 117 patients atteints de 460 carcinomes basocellulaires. Les douleurs et les réactions phototoxiques étaient moindres avec ces paramètres [256].

Avec la benzoporphyrine, on observe une régression significative du volume tumoral 21 jours après le traitement par laser à 150 J/cm^2, à 690 nm chez des souris nudes atteintes de CSC[257]. Les dérivées de benzoporphyrine sont efficaces pour le traitement des tumeurs vasculaires.

Après l'injection IV de 1 mg/kg de benzoporphyrine à des souris atteintes d'angiosarcome, l'illumination provoquait l'inhibition de la croissance et la disparition tumorale[258]. La PTD avec la benzoporphyrine (14 mg/m^2 IV, à 688 nm, 60-180 J/cm$^{2)}$ de 54 patients atteints de 421 CBCn, CBCs et de maladie de Bowen permettait d'obtenir des taux de RC de l'ordre de 93% à 6 mois[259]. La photosensibilisation est plus courte (3-4 jours) par rapport à celle provoquée par le Photofrin®.

Des premiers essais cliniques dans les tumeurs malignes cutanées ont été réalisés avec le Photofrin®. Toutefois, son principal inconvénient est une photosensibilité rémanente prolongée, a conduit au développement de la PTD topique en dermatologie. Les principaux inconvénients de l'application topique des PS sont leur faible solubilité, leur faible pénétration à travers le stratum cornéum et donc une faible pénétration intra-cellulaire. La découverte d'AAL est à l'origine du développement de la PTD topique en onco-dermatologie[5].

E- La Photothérapie dynamique topique en Onco-dermatologie

Le traitement des cancers cutanés par PTD topique s'est rapidement développé dans de nombreux pays car son principe combinait une application topique de 2-4 h d'AAL, d'un précurseur naturel de PpIX, et l'illumination par une source lumineuse rouge.

La AAL-PTD est utilisée en onco-dermatologie pour le traitement de carcinomes basocellulaire superficiel (CBCs), de maladie de Bowen (MB) et des kératoses actiniques (KA)[120].

En fait, c'est en 1955 qu'était décrite, pour la première fois, une photosensibilité après une application exogène d'AAL[260]. L'administration sous cutanée ou par voie orale montrait les mêmes résultats[261-263].

Les premiers résultats cliniques de l'AAL-PTD ont été présentés par Kennedy en 1990. Après l'application d'une émulsion d'AAL à 20% et une incubation de 3-6 h, les lésions cutanées tumorales étaient exposées à la lumière d'un projecteur de diapositives de 500 W, dont l'intensité variait de 150-300 mW/cm^2 avec une dose totale délivrée de 15-150 J/cm^2 (à 600nm). Quatre vingt dix pour cent des 80 CBCs étaient en RC à 3 mois du traitement et la totalité des MB et des KA[5]. Les TRC à 3 mois étaient de 79% lors du traitement de 300 CBCs[115]. L'épaisseur des tumeurs influence les taux de réponse avec histologiquement la persistance des composants dermiques profonds des CBCn[133]. L'incubation minimale

nécessaire est de 3h et plusieurs séances de traitement s'avèrent nécessaire sans conséquences néfastes. La PTD topique avec l'AAL permet d'obtenir 79 à 100% de TRC à 3 mois pour les carcinomes basocellulaires superficiels (CBCs) et 10 à 75% pour les carcinomes basocellulaires nodulaires[264,265]. De plus, Fink-Puches *et al* rapportaient l'efficacité de la PTD après l'administration d'AAL en intra-lésionnel dans le traitement d'un CBC[266].

La PTD topique a montré son efficacité pour le traitement des kératoses actiniques (KA) du scalp et de la MB avec des résultats cosmétiques supérieures aux techniques de traitements conventionnels[264,267,268]. Les TRC après une PTD topique avec le méthyl aminolévulinate (MAL-PTD) (PhotoCure ™, en lumière rouge (570-670 nm), à 75 J/cm^2) s'échelonnent entre 69 et 91% à 3 mois dans le traitement des KA[269-272]. La MAL-PTD est supérieure à la cryothérapie pour la traitement des KA avec des résultats cosmétiques excellents[272]. Aucune différence n'a été observée en terme d'efficacité entre l'AAL-PTD et MAL-PTD dans le traitement des KA. Cependant l'utilisation de la forme estérifiée de l'AAL rendrait la séance de traitement moins douloureuse[144]. Une étude multicentrique évaluant l'efficacité de la AAL-PTD (Levulan® et la Lampe BLU-U™) dans les KA indiquait des TRC de 78% à M12[132].

Chez les transplantés rénaux, la PTD topique permet de réduire les risques de récidive de KA avec 62% de TRC versus 35% dans le groupe contrôle non traité et le temps de réapparition de KA de 9,6 mois versus 6,8 mois respectivement[273]. La MAL-PTD a une efficacité supérieure au 5-FU pour le traitement des MB et KA chez les transplantés[274]. Le traitement de la chéilite actinique repose sur des techniques invasives : vermillonectomie, laser CO_2 ou Er : YAG. La PTDT permet d'obtenir une RC dans 47% des cas à 3 mois après deux séances. La rémission histologique[5] est décevante à 38%[275].

La MAL-PTD a montré une efficacité intéressante dans les CBCn dans des études multicentriques randomisées et contrôlées avec des taux de récidive à 5 ans de 14% versus 4% dans le groupe chirurgie ; les résultats esthétiques sont estimés excellents et supérieurs[146]. Pour le traitement de CBCs, avec la MAL-PTD, on observait des résultats comparables à la chirurgie d'exérèse à 3 mois, respectivement avec des TRC de 87,4% versus 89,4% mais toujours avec une supériorité esthétique. Les TRC sont comparables avec la cryothérapie dans le suivi à long terme[6]. Enfin, une étude multicentrique randomisée, contrôlée et prospective

[5] disparition complète de reliquats tumoraux à l'examen anatomopathologique

montrait l'efficacité de la MAL-PTD dans la MB avec des TRC de 80% avec la PTD, 67% avec la cryothérapie et 69% avec le 5-FU à 12 mois. Elle soulignait une supériorité cosmétique. Les TRC à 2 ans étaient respectivement de 68%, 60% et 59%[276].

D'autres agents photosensibilisants topiques ont été testés. Le méso-tétraphénylporphynesulfonate tetrasodium (mTPPS) permet d'obtenir 94% de TRC pour le traitement des CBCs dans une étude ouverte[277]. Son développement est freiné par l'existence d'une photosensibilité prolongée et d'une neurotoxicité. Le méso-tétrahydroxyphénylchlorin (mTHPC) a donné des résultats médiocres, avec des taux de rémission histologique respectivement de 32% dans les maladies de Bowen et 29% dans les CBCs[278].

En dermatologie, l'optimisation de la PTD topique est nécessaire pour obtenir des taux de rémission clinique complète élevés, sans récidive, dans le traitement des cancers cutanés. Le décapage de la lésion avant la séance, l'utilisation d'une forme estérifiée d'AAL augmentent les TRC dans les CBCn à 91% à M17[6,279]. La principale limite des études actuellement est l'absence de contrôle histologique de la rémission. Seul Wang et *al*, montre que les TRC clinique et histologique ne sont significativement pas différents entre la PTD et la cryothérapie dans le traitement des CBCn et CBCs. Les taux de récidive sont de 25% à 12 mois pour la PDT et 15% pour la cryothérapie [280].

L'utilisation de chélateur de fer avec AAL permet d'augmenter *in situ* les taux de PpIX et donc l'efficacité de la PTD dans le traitement des cancers cutanés non mélaniques[281,282].

L'ATMPn peut aussi être appliqué localement dans le traitement des CBC en montrant une excellente pénétration épidermique[283].

II-Le mélanome

Le mélanome est une tumeur maligne développée à partir des mélanocytes survenant en peau saine ou par dégénérescence d'un naevus pré-existant.

A- Généralités et Epidémiologie

Le mélanome est le cancer cutané dont la fréquence augmente le plus dans le monde. Il représente 5% des cancers de la peau et 1% des tumeurs malignes. Elle double tous les 10 ans avec une incidence de 5 à 15 nouveaux cas pour 100 000 habitants par en Europe[284]. En France, le taux d'incidence est de 8 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants chez

l'homme et 9,4 chez la femme, représentant 4000 à 5000 nouveaux cas et 1000 personnes en meurent chaque année. L'incidence a augmenté entre 1980 et 2000 chez l'homme de $2,4.10^{5}$ à $7,6.10^{5}$ par an et chez la femme de $3,9.10^{5}$ à $9,5.10^{5}$ par an[285]. Ce taux est bien plus élevé en Australie et en Nouvelle-Zélande (40-50 nouveaux cas pour 100000 habitants). En Europe, le mélanome est plus fréquent chez la femme que chez l'homme. Le risque cumulatif de développer un mélanome sur une vie est de 1% en France[286].

Depuis quelques années, l'incidence et la mortalité se stabilisent en Europe, cela semble lié à une détection plus précoce plus qu'à un meilleur traitement[287]. En effet, l'incidence de mélanome de faible épaisseur augmente[288]. Le risque de développer un mélanome est le résultat d'une conjonction de facteurs constitutionnels (phototype) et externes (exposition aux UV). Cela dépend aussi du nombre et du type de naevus, de facteurs environnementaux (antécédents de coup de soleil, des abus des expositions solaires en institut), et des antécédents personnels et familiaux[289].

On constate que 5 à 10% des patients atteints de mélanome ont un parent du premier degré atteint. On parle de mélanome familial. Ces patients développent un mélanome plus précocement et ont un risque plus élevé de mélanomes multiples. Vingt pour cent de ces familles ont une mutation germinale du gène *CDKN2A*, gène suppresseur de tumeur codant la protéine *p16*[290,291]. La pénétrance de ces mutations est influencée par les facteurs environnementaux et/ou génétiques. D'autres gènes sont impliqués : *CDK4*[292], *MC1R*[293], *ASIP*, *TYR*[294].

B- Les traitements conventionnels du mélanome

Les traitements du mélanome utilisent une classification pronostique fondée sur des courbes de survie. Elle s'apparente à une classification d'indication thérapeutique : la classification American Joint Commitee on Cancer (AJCC) (Tab-1).

Stades	Critères
Stade IA	Tumeur inférieure ou égale à 1 mm d'épaisseur, niveau de Clark II ou III, sans ulcération (pT1a), N0, M0
Stade IB	Tumeur inférieure ou égale à 1 mm d'épaisseur, niveau de Clark IV ou V ou avec ulcération (pT1b), N0, M0 Tumeur supérieure à 1 mm et inférieure ou égale à 2 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT2a), N0, M0
Stade IIA Stade IIB	Tumeur supérieure à 1 mm et inférieure ou égale à 4 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT2b, pT3b), N0, M0 Tumeur supérieure à 2 mm d'épaisseur, sans ulcération (pT3a, pT4a), N0, M0
Stade IIC	Tumeur supérieure 4 mm d'épaisseur, avec ulcération (pT4b), N0, M0
Stade IIIA	Tumeur sans ulcération (tous pT), métastases microscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux (N1a, 2a), M0
Stade IIIB	Tumeur sans ulcération (tous pT), métastases macroscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou métastases « en transit » (N1b, 2b, 2c), M0 Tumeur avec ulcération (tous pT), métastases microscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux ou métastases « en transit » (N1a, 2a, 2c), M0
Stade IIIC	Tumeur avec ulcération (tous pT), métastases macroscopiques dans 1, 2 ou 3 ganglions lymphatiques régionaux (N1b, 2b), M0 Tumeurs avec ou sans ulcération (tous pT), métastases dans 4 ganglions lymphatiques régionaux ou plus ou métastases en transit avec métastase(s) ganglionnaire(s) régionale(s) (N3)
Stade IV	Métastases à distance (tous pT, tous N, M1)

Tableau 1- Classification p TNM de l'AJCC 6ème édition [295]

La chirurgie demeure le traitement de référence du mélanome primitif suivie d'une reprise chirurgicale avec des marges d'exérèse déterminée par l'épaisseur tumorale (indice de Breslow) (Tab-2).

Les Standards, Options et Recommandations

Définition des marges d'exérèse

Standards

Les marges d'exérèse doivent être adaptées à l'épaisseur de la tumeur.
Aucune marge supérieure à 3 cm ne doit être réalisée.

Épaisseur de Breslow (classification)	Marges d'exérèse recommandées
Mélanome *in situ* (Ptis)	=> 0,5 cm
0 - 1 mm (Pt1)	=> 1 cm
1,01 - 2 mm (Pt2)	=> 1-2 cm
2,01 - 4 mm (Pt3)	=> 2 cm
> 4 mm (Pt4)	=> 2-3 cm

Pour les **mélanomes de Dubreuilh non invasifs**, une marge de 1 cm est recommandée. Lorsque cette marge ne peut pas être respectée pour des raisons anatomiques et fonctionnelles, une marge de 0,5 cm est acceptable sous couvert d'un contrôle histologique strict des berges (accord d'experts).

Tableau 2- Détermination des marges d'exérèse en fonction de l'indice de Breslow [296]

La reprise chirurgicale de la cicatrice initiale d'exérèse est le seul traitement curatif du mélanome stade I et II à l'heure actuelle. Elle doit être précoce (dans les 4 à 6 semaines suivant l'exérèse initiale) et large (marge adaptée à l'épaisseur). L'exérèse du ganglion sentinelle peut être indiquée en option pour les patients atteints de mélanomes d'épaisseur supérieure à 1 mm ou ulcéré dans le cadre d'essais thérapeutiques ou de protocoles d'évaluation[296]. Elle permet de classer les patients en stade III en mettant en évidence l'existence de métastases ganglionnaires microscopiques ou macroscopiques. Ceci conduit à la mise en route de traitements adjuvants selon les avis d'experts.

Des traitements adjuvants (Interféron-alpha 2a à faibles doses[6]) sont proposés pour les stades II (Breslow >1,5 mm sans atteinte ganglionnaire, ni extension cutanée). En effet, l'interféron alpha possède une activité anti-tumorale : ralentissement du cycle cellulaire, baisse du taux de passage en phase S. Il possède une activité d'immunomodulation en stimulant l'activité des cellules natural killer, l'hyperexpression du système HLA et de certains motifs antigéniques tumoraux. L'interféron-alpha 2b à haute dose[7] peut-être proposé en cas d'envahissement ganglionnaire[297]. Ce dernier protocole permet la prolongation de la survie sans récidive, mais ne modifie pas la survie globale[298]. Les taux de réponse sont de l'ordre de 15% avec une médiane de 6 à 9 mois.

Les récidives et les métastases surviennent dans 25% des cas dans les premières années suivant le diagnostic initial. Toutefois des récidives tardives plus de 10 ans après sont possibles. Le risque de récidives est étroitement lié à l'épaisseur du mélanome initial. La majorité des métastases sont initialement cutanées et lymphatiques puis pulmonaires, hépatiques et cérébrales plus rarement osseuses et digestives.

Lorsque le mélanome atteint le stade métastatique non opérable, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de traitement réellement efficace permettant de modifier le cours de la maladie et son issue le plus souvent fatale[299]. En effet, les traitements des stades IV sont décevants avec des taux de réponse de l'ordre de 10 à 20%. La médiane de survie des patients au stade IV est de 6 à 9 mois[300]. La survie à 5 ans des patients atteints de mélanomes métastatiques est de 7 à 19%[301]. Malgré le développement de nouveaux traitements, le pronostic n'a pas changé depuis ces 20 dernières années. La prévention et la détection précoce du mélanome sont donc essentielles. L'exérèse chirurgicale de la métastase (unique et opérable) est associée à une meilleure survie et reste considérée comme le traitement de choix avec des médianes de

[6] 3 MUIx3/sem en injection sous-cutanée

[7] 20 MUI/m^2/j en injection intraveineuse pendant 4 semaines puis 10 MUI/m^2/3x/sem sous-cutané 48 semaines)

survie de 17 mois versus 4 mois en l'absence de traitement chirurgical[302-304]. Lorsque les métastases sont multiples, étendues ou inopérables, d'autres traitements sont proposés.

Parmi les monochimiothérapies, la dacarbazine, un agent alkylant, permet d'obtenir les meilleurs taux de réponses de l'ordre de 15 à 20% avec 5% de réponse complète viscérale (foie, poumon et os)[305]. La médiane de durée de réponse n'excède pas 6 mois. Avec la fotemustine, un nitroso-urée, on obtient des taux de réponse de l'ordre de 20 à 30%. Il présente l'avantage de passer la barrière hémato-méningée, et aussi traiter des métastases cérébrales[306]. Les autres agents de la même famille (carmustine, lomustine) possèdent des taux de réponses plus modestes entre 13 et 18%. Le temozolomide, le précurseur de la dacarbazine, ayant la capacité de traverser la barrière hémato-méningée, est aussi efficace que la dacarbazine[307]. Les taxanes (paclitaxel, doxitaxel) ont des taux de réponses partielles de 12 à 17% au cours des essais de phase II[308]. Avec le cisplatine, les taux de réponses globales de 16,3% sont atteints[309]. Les taux de réponse avec les alcaloïdes de la pervenche (vindésine, vinblastine, vincristine) sont de l'ordre de15%.

En utilisant des polychimiothérapies (dacarbazine, cisplatine, taxanes et BCNU), on obtient des taux de réponses globales supérieurs (40 à 50%), mais sans augmenter la survie globale, et au prix d'effets indésirables importants et graves[310]. Ainsi les polychimiothérapies ont des taux de réponse meilleurs, sans toutefois, augmenter les taux de réponse complète par rapport aux monochimiothérapies.

L'immunothérapie par l'interleukine 2 (IL-2) permet d'atteindre 16% de taux de réponse et 6% de taux de réponse complète dans des protocoles de polychimiothérapie[311,312]. Les taux de réponses avec l'interféron sont de l'ordre de 6 à 27%[313].

Historiquement, on a toujours décrit le mélanome comme radiorésistant[314]. La radiothérapie est utilisée principalement pour le traitement palliatif des métastases mélaniques cérébrales ou osseuses. Les taux de réponses au stade III sont de l'ordre de 60 à 79% et les taux de réponse complète sont estimés à 9%.

C-. Les perspectives d'avenir dans le traitement des mélanomes métastatiques

Le mélanome est considéré comme une tumeur immunogénique et des régressions complètes ou partielles, comme la présence de lymphocytes activés dans le tissu tumoral et l'existence d'un vitiligo en témoignent. De nouvelles approches thérapeutiques sont nées de ce constat. Certaines sont en cours d'évaluation mais ne modifient pas encore la survie globale au stade

métastatique : la vaccination anti-tumorale, les thérapies ciblées (Anticorps monoclonaux anti-CTLA4 (Cytotoxic T Lymphocytes associated antigen 4)) et l'immunothérapie adoptive par TIL (Tumour infiltrating lymphocytes).

Les traitements par vaccination n'ont pas leur place dans le traitement des mélanomes métastatiques au vu des premiers essais. Plusieurs types de vaccins ont été développés à partir de mélanocytes humains irradiés, d'extraits antigéniques (protéines, ganglioside), d'oncolysats autologues et de vaccins recombinants. En effet, l'identification de peptides antigéniques exprimés par les mélanomes et reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques a permis d'améliorer grandement les protocoles cliniques. On distingue, d'une part, les classes d'antigènes exprimés exclusivement par les mélanomes (MAGE-1, MAGE-3, NA 17). D'autre part, il y a ceux que l'on retrouve à la surface des mélanomes, mais aussi sur les mélanocytes normaux (tyrosine, gp100, melan A). Les patients sont identifiés par un typage HLA et la recherche de l'expression du gène candidat est effectuée par analyse en RT-PCR d'un échantillon tumoral.

L'immunothérapie adoptive par TIL consiste à récupérer à partir du tissu tumoral, des lymphocytes du patient. La seconde étape consiste à les amplifier *in vitro* avec des lymphokines, pour sélectionner les lymphocytes spécifiques des antigènes tumoraux. Enfin les cellules sont réinjectées au patient dans le but qu'ils réinfiltrent la tumeur et provoque sa lyse. Les taux de réponses vont de 31 à 35% et avec un taux moyen de survie de 4 mois[315,316].

Une nouvelle immunothérapie repose sur l'administration d'anticorps monoclonaux anti-CTLA4 (ipilimumab, tremelimumab). L'anticorps inhibe la liaison CTLA4 sur les lymphocytes et les molécules CD80/CD86 sur les cellules présentatrices d'antigène. Deux anticorps ont été testés dans les mélanomes métastatiques. Les taux de réponse sont retardés et prolongés[317]. En bloquant le CTLA4, on lève le frein de la prolifération lymphocytaire permettant à B7 de se lier à CD28, et d'enclencher la réponse lymphocytaire maximale.

Une partie des avancées récentes dans le domaine thérapeutique du mélanome s'appuie sur l'existence de différents types de mélanome avec par voies de conséquences des altérations moléculaires somatiques différentes. Ainsi, on retrouve entre 50 et 60% de mutation de BRAF au sein des mélanomes de type SSM (Superficial spreading melanoma) et 10 à 15% au cours des mélanomes muqueux. Les mutations de certains genes provoquent des « gains de fonctions », fonction quasi inverse à celle de la protéine sauvage. Elles peuvent être des cibles à de nouvelles thérapies du mélanome. Il s'agit pour la plupart de molécules inhibant les fonctions kinases des protéines mutantes : inhibiteur du récepteur KIT : imatinib. Elles ont été testées chez des patients porteurs de mélanome avec mutation de KIT avec des résultats

prometteurs[318]. Des inhibiteurs de mutation de BRAF permettent d'obtenir des taux de réponses de l'ordre de 70% dans les essais de phase I. Cependant, 40 à 50% des mélanomes ne présentent pas de mutations de ces cibles.

D- Le traitement des métastases cutanées de mélanome

L'existence de métastases cutanées « en transit » signifie que les lésions sont situées entre la cicatrice d'exérèse initiale et le territoire ganglionnaire de drainage, de 2 à 5 cm du site primitif. Les patients atteints de métastases en transit sont des patients classés en stade III. A l'inverse, les métastases situées à distance c'est-à-dire au-delà de 5cm du site de la tumeur primitif et pas dans le territoire de drainage, classent la maladie en stade IV. Les métastases cutanées sont à l'origine d'ulcérations douloureuses et de saignements[319]. Elles sont, par conséquent, responsables d'une altération majeure de la qualité de vie.

Lorsque leur nombre et leur taille sont limités et qu'il y a peu de récurrences, le traitement de première intention fait appel à la chirurgie. Des traitements par laser CO_2, par cryochirurgie ou par radiothérapie sont utilisés pour des tumeurs de petites tailles et peu profondes[320]. Dans le cas contraire d'autres alternatives de traitement peuvent être proposées. Les mêmes chimiothérapies (dacarbazine, fotemustine, sels de platines, taxanes…) que celles utilisées dans les autres sites métastatiques, ont été essayées. On obtient des résultats variables et proche des taux de réponses précédemment décrites avec les autres localisations métastatiques.

D'autres approches thérapeutiques plus ciblées sur la localisation cutanée ont été développées : l'injection intra-lésionnelle d'interleukine[321], la perfusion de membre isolé, l'électrochimiothérapie… L'injection intra-lésionnelle d'interleukine-2 permet d'obtenir des taux de réponse de 16% et 6% de réponses complètes[322].

La technique de perfusion de membre isolé (circulation extra-corporelle de membre à circuit fermé sous garrot) a pour objectif d'administrer des concentrations de Melphalan® 10 fois supérieures aux doses systémiques tolérables, afin de cibler au maximum le volume tumoral tout en minimisant les effets secondaires généraux. Les taux de réponses globales avec cette technique sont de l'ordre de 50 à 70% en améliorant le contrôle local de la maladie mais sans impact sur la survie globale[319,323]. L'association de TNF alpha au Melphalan® augmente les taux de réponse à 60-80%, mais majore les effets secondaires.

L'électrochimiothérapie consiste à appliquer des impulsions électriques au contact des tumeurs cutanées ou sous-cutanées en ayant injecté au préalable un cytotoxique[324]. Ces

impulsions électriques rendent les membranes des cellules cancéreuses temporairement perméables, ceci augmente l'action du cytotoxique utilisé (bléomycine, cisplatine)[325].

La BCGthérapie permet d'obtenir des taux de réponse de l'ordre de 90% et 31% de taux de survie sans récidive au prix de complications locales invalidantes[326].

L'ensemble des traitements utilisés pour traiter les métastases cutanées de mélanome demeure décevant. Avec certains d'entre eux, on obtient des taux de réponse de l'ordre de 90%, mais les rémissions sont bien souvent partielles et peu prolongées.

E- L'utilisation de la PTD dans le traitement du mélanome

1. Les études *in vitro* et chez l'animal

La PTD systémique avec le Photofrin® a montré son efficacité *in vitro* chez la souris nude avec xénogreffe de mélanomes achromiques avec 100% de nécrose tumorale. La mélanine semble empêcher la pénétration de la lumière diminuant aussi l'efficacité de la PTD[327]. En conséquence, on doit utiliser des doses d'illumination plus deux fois plus importantes chez les cobayes après l'administration de 10 mg/kg d'HpD et une illumination à 514 nm[328]. Moore *et al* montraient également que les souris albinos BALB/c étaient plus sensibles que les souris pigmentées, démontrant l'effet protecteur de la pigmentation[329]. L'une des hypothèses pour expliquer le manque d'efficacité de la PTD dans le mélanome, et une efficacité dans les mélanomes achromiques est la présence de mélanine. Cette dernière pourrait entrer en compétition avec le PS pour l'absorption des photons[327]. L'absorption de la lumière incidente par la mélanine entrainerait une importante réduction de la pénétration en profondeur du faisceau lumineux dans la tumeur[330]. De plus, ce pigment piègerait les radicaux libres produits. L'une des stratégies pour traiter des mélanomes en PTD a alors été de cibler non plus la tumeur mais la néovascularisation tumorale en utilisant la PTD systémique et la bactériochlorophylle sérine chez des souris nudes atteintes de mélanome M2R[331]. Pour cela, l'illumination était réalisée peu de temps après l'injection intra-veineuse du PS. L'HpD est capable de se fixer sélectivement sur les vaisseaux et d'autres structures non vascularisées de l'œil. La clairance d'élimination est de moins de 24h sauf au sein de la tumeur, la choroïde et la rétine chez le lapin[332].

L'oxygène est nécessaire à la réaction photodynamique et le fractionnement de l'illumination permettrait la réoxygénation de la tumeur. Ceci augmenterait l'efficacité de la PTD dans le mélanome, lors de l'utilisation de bactériochlorophylle sérine en intra-tumorale[333].

La PTD systémique avec la phthalocyanine d'aluminium (AlpcS4), à la dose de 2,5 mg/kg intra-péritonéale, avec des puissances d'illumination de 50, 100 et 200 J/cm^2, de souris C57/B1 atteintes de mélanome (obtenu par injection sous-cutanée de mélanocytes tumoraux murins B16) diminuait la viabilité cellulaire *in vitro.* On notait une incorporation de la thymidine et une nécrose tumorale *in vivo*. Les souris traitées par PTD survivaient 41 j versus 15 jours dans le groupe contrôle non traité, et il existait un ralentissement de la progression tumorale[334]. Les mêmes résultats étaient obtenus avec la phthalocyanine de silicone liposomée sur des B16[335]. En utilisant le phthalocyanine de zinc, Michailov *et al* démontraient avec les mêmes lignées B16 et sur modèle animal, l'importance de la puissance d'illumination avec un taux de réponse complète de 40% à 380 mW/cm^2[336]. Des puissances supérieures ne semblaient pas permettre d'obtenir de meilleurs résultats. Ils observaient aussi une nécrose tumorale et soulignaient le rôle de l'hyperthermie au cours de la séance provoquée par l'utilisation de longueur d'onde de 700 nm[337].

Dans les années 80, des mélanomes choroïdiens ont été traités en PTD avec Photofrin®[338,339]. On notait peu de succès pour plusieurs raisons : les patients présentaient des stades avancés de la maladie et en rechute, le PS (HpD) avait une faible pénétration tissulaire et les lasers étaient peu performants. Le développement des PS de seconde génération donnait lieu à des études chez l'animal, avec des résultats encourageants pour les mélanomes achromiques avec des phthalocyanines et des benzoporhyrines[340-342]. Toutefois, l'application en clinique paraissait difficile car les mélanomes choroïdiens sont dans 90% des cas pigmentés. La PTD systémique avec la benzoporphyrine liposomale, à la dose de 2 mg/kg IV, illuminée 15 min après avec un laser Argon à 692 nm et 40-150 J/cm2, chez des lapins albinos avec mélanome choroïdien, montrait une régression des tumeurs dans tous les yeux à 60 J/cm^2. Les examens autopsiques des lapins révélaient des occlusions vasculaires et une nécrose tumorale 1 mois après le traitement avec un infiltrat de cellules mononuclées[343]. La benzoporphyrine est 60 à 70 fois plus cytotoxique que l'HpD et a une meilleure rétention tissulaire[344,345]. Une PTD systémique avec le Verteporfin® (4 mg/kg IV) de tumeurs mélaniques obtenues après l'injection de B16F10 à des souris C57/BL6 induisait une nécrose tumorale. De plus, on observait un ralentissement de la croissance tumorale après 2 illuminations à 3 h et 9 h par un laser argon à 690 nm et 300-520 J/cm^2[346].

D'autres PS ont été essayés *in vitro* avec des résultats prometteurs : indocyanine verte [347], le lutétium texaphyrine [150], la meso-tetra-4-N-methylpyridyl-porphyrine iodide (P1) et la 5,10-di-(4-acetamidophenyl)-15,20-di-(4-N-methylpyridyl) porphyrine (P2), 2 PS hydrosolubles[348]. Une iminochlorine induisait des effets phototoxiques par une voie apoptotique sur une lignées de mélanocytes tumoraux humains (G361)[349]. La PTD systémique avec la m-TPP (méso-tétraphénylporphyrine) liposomale sur des souris nudes atteintes de mélanome achromique montrait une efficacité supérieure ou égale à la forme sulfonée[162].

Les cellules mélanocytaires tumorales murines (B16F10) ont la capacité de produire en grande quantité des porphyrines à partir d'AAL ou de MAL[327]. *In vivo*, les mélanomes après application de ces molécules et illumination ne fluorescent pas. On suppose que ceci est du à la présence de pigment et de la faible production endogène de porphyrine par les mélanocytes tumoraux et à l'expression de protéines MDR (à l'origine de l'expulsion de la molécule)[350]. A l'inverse, une réponse partielle à la PTD topique ou systémique et une fluorescence intense ont été observées par des tumeurs mélanocytaires obtenues par injections sous cutanées de cellules mélanocytaires tumorales achromiques (*A-Mel-3*) chez des hamsters golden syrian[351]. Les cellules mélanocytaires tumorales issues de métastases accumulent plus de porphyrines que les cellules issues de tumeurs primaires [113]. L'illumination de mélanomes achromiques implantés à des hamsters gold syrian, 1 min après injection de l'ATMPn en intra-veineuse, aboutissait à la régression complète des tumeurs[352]. L'AAL-PTD paraît inefficace pour le traitement des métastases cutanées de mélanome[353].

Les études analysant les effets de la PTD sur les mélanomes montrent des résultats contradictoires. D'une part, les études *in vitro* et sur modèles animaux démontrent que les mélanocytes tumoraux sont sensibles à la PTD. D'autre part, les essais sur l'homme montrent des résultats inférieurs[354].

2. Les études chez l'homme

La PTD systémique pour traiter les métastases cutanées de mélanome ne permet d'obtenir que 20 à 30% d'efficacité clinique chez les patients[355,356].

Les résultats de la PTD systémique avec l'HpD dans les mélanomes choroïdiens chez l'homme sont encourageants. En effet, la PTD systémique avec le Photofrin®, à la dose de 5 à 7,5 mg/kg intra-veineuse, avec une illumination 24h après, à 620-630 nm par laser, permettait l'obtention de 6 RC et 5 RP chez 19 patients atteints de mélanome choroïdien. Les tumeurs pigmentées semblaient répondre moins bien que les tumeurs peu pigmentées[357,358]. La PTD

avec le Photofrin® a une efficacité moindre parce qu'il y a compétition entre l'absorbance de la mélanine et la longueur d'onde utilisée[9]. L'emploi de longueur d'onde entre 770 et 800 nm permet une transmission suffisante de lumière à travers les tissus pigmentés[359].

La PTD systémique avec la chlorine-e6 apparaît efficace sur les métastases cutanées de mélanome. La chlorine était injectée à la dose de 5 mg/kg en intraveineux à 14 patients atteints de métastases cutanées de mélanome. Deux séances étaient réalisées 1h et 24 heures après l'injection à 80-120 J/cm^2 et 300 mW/cm^2. On observait une régression complète des métastases traitées sans photosensibilité et avec une excellente tolérance[360].

Les métastases cérébrales de mélanome surviennent chez 3,5% des malades. La survie globale n'excède pas 22 semaines malgré les traitements chimiothérapiques et radiothérapiques. La PTD avec le Photofrin® a permis d'obtenir un excellent contrôle local des métastases chez 6 patients atteints de métastases de mélanome[361].

L'utilisation de la PTD dans le traitement des mélanomes est controversée par son manque d'efficacité *in vivo* et le développement de mélanome sur les sites traités par PTD. En effet, Wolf *et al* rapportaient l'apparition d'un mélanome du cuir chevelu 6 mois après 7 séances de PTD pour des kératoses actiniques[362].

III-Les effets biologiques de la lumière visible

La phototoxicité de la lumière naturelle (soleil) ou artificielle est connue depuis de nombreuses années[363,364]. La lumière visible a été étudiée depuis des années comme une source de lumière capable d'activer des substances photoactives et de manière plus récente, elle est employée comme un agent thérapeutique elle-même. L'une des premières utilisations rapportées de la lumière visible en thérapeutique est la photothérapie des ictères néonataux avec de la lumière bleue au cours des années 1970. Le rythme circadien est un cycle biologique réglé par l'alternance du jour et de la nuit et dépend de la lumière visible.

La lumière visible influence la réponse immune. Les lymphocytes B sont plus actifs le matin et à l'inverse les lymphocytes T et les cellules NK sont plus actifs le soir[365]. La lumière visible accélère la cicatrisation d'ulcère de jambe en stimulant la prolifération de kératinocytes humains et/ou de fibroblastes en induisant la production de facteurs de croissance en particulier le bFGF[366,367].

Mais la plupart des études ont essentiellement démontré des effets biologiques avec la lumière bleue.

La lumière bleue correspond aux longueurs d'onde du visible les plus courtes entre 400 et 500nm. La lumière bleue est hautement énergétique puisque plus la longueur d'onde est courte plus l'énergie photonique est grande.

Les photons des rayonnements bleus sont absorbés par les chromophores des pigments visuels des photorécepteurs. Cependant, une partie de l'énergie non absorbée est convertie en chaleur et l'autre est à l'origine de radicaux libres phototoxiques et de l'oxygène singulet. Comme les UV, elle est donc capable d'induire des lésions de l'épithélium pigmentaire rétinien. Ces lésions phototoxiques pourraient être à l'origine des mécanismes de dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA). Si la phototoxicité des UV sur l'épithélium rétinien est connue depuis les années 80, la découverte de la phototoxicité de la lumière bleue est plus récente[368]. Lorsque les patients vieillissent, on observe une augmentation des taux de lipofuscine (A2E) qui est alors multiplié par 5[369]. Sparrow a établi *in vitro* la corrélation entre la phototoxicité de la lumière bleue, l'épithélium pigmentaire rétinien, la lipofuscine (A2E) et l'apoptose conduisant à la DMLA[370]. L'exposition de poissons tropicaux en UV-A et en lumière visible (>320 nm) provoque précocement l'apparition de mélanomes[371].

La lumière bleue influence les modes veille-sommeil : elle est responsable à 55% de l'entraînement circadien[372]. La transmission de la lumière bleue intervient dans la discrimination des couleurs, laquelle décroit de façon linéaire avec l'âge, essentiellement dans la partie bleue du spectre visuel.

La photoactivité de la lumière bleue est utilisée en thérapeutique. Elle est employée depuis quelques années en dermatologie pour traiter les acnés[373]. Elle agit sur la bactérie responsable de l'acné, le *Proprionibacterium acnes*, sensible à la lumière bleue de façon physiologique. Cette bactérie est capable de relarguer une porphyrine qui est excitée par cette lumière et induit de ce fait sa propre mort. Le traitement de l'acné par la lumière bleue est une technique innovante utilisant la lumière bleue seule ou en association avec l'application préalable d'AAL en photothérapie dynamique[374,375]. Elle est également employée et approuvée aux Etats-Unis pour traiter les kératoses actiniques avec le Levulan® Kérastick et la lampe BLU-U. La lumière bleue pénètre peu au sein des tissus limitant son utilisation aux traitements de lésions peu profondes. Les CBCs dans les naevomatoses basocellulaires sont détruits après application AAL et illumination en lumière bleue. Elle semble prévenir les récidives en traitant les zones infra-cliniques[376].

En médecine dentaire, la lumière bleue (380 nm-500 nm) permet d'activer (par production de radicaux libres activant un catalyseur) et de polymériser (la résine du composite) des produits dentaires (comme les amalgames dentaires). Elle est aussi utile pour la photodétection des

caries, le dépistage précoce des dysplasies et cancers de la cavité orale et enfin le traitement des parodontites chroniques de l'adulte.

En pédiatrie, elle est utilisée pour traiter les ictères néonataux. Toutefois, l'innocuité n'est pas absolue puisqu'il a été démontré que la lumière bleue était capable d'engendrer un stress oxydatif au niveau rétinien, mécanisme à l'origine de la DMLA.

Les lumières violette, verte et rouge sont utilisées en PTD avec des résultats variables en terme d'efficacité, selon la pathologie traitée et les longueurs d'onde d'excitation des PS employés.

A- La photothérapie néonatale, le développement de naevus et le risque de mélanome

Plusieurs facteurs phénotypiques de risque de mélanome ont été identifiés : le nombre élevé de naevus, la présence de naevus dysplasiques, l'existence d'éphélides, la forte propension de coups de soleil et le nombre de coups de soleil sévères dans l'enfance[377].

La prévalence des naevus chez l'enfant augmente avec l'âge. L'exposition solaire est un des déterminants majeurs du développement de naevus. Il a été prouvé qu'à phototype équivalent, les enfants habitant dans des pays de latitude basse ont plus de naevus, que ceux vivants dans les latitudes plus hautes. Par ailleurs, l'exposition solaire précoce des enfants avant l'âge de 15 ans favorise l'apparition des naevus[378]. Le facteur le plus important de risque de développer un mélanome dans les populations caucasiennes est le nombre de naevus acquis[379].

La photothérapie néonatale (450 nm) est la thérapeutique de choix la plus efficace et la plus utilisée pour traiter les ictères néonataux[380]. L'ictère néonatal est un événement fréquent puisqu'il touche 2 nouveaux-nés sur 3 et 80% des prématurés. L'ictère correspond à une coloration jaune des téguments, apparaissant à partir d'un taux de 50 à 70 µmol/l de bilirubine non conjuguée. La bilirubine est un pigment jaune ne pouvant donc qu'absorber la lumière bleue, violette ou verte. Des études ont montré la supériorité de la lumière bleue[381]. Le risque est la neurotoxicité de la bilirubine non conjuguée, avec encéphalopathie et risque de surdité.

L'hyperbilirubinémie est due à une augmentation de sa production alors que son métabolisme et son excrétion sont encore peu développés par immaturité hépatique[382]. Parmi les particularités du métabolisme chez le nouveau-né, on note un déficit de glycuroconjugaison associé à une conjonction de multiples facteurs comme l'hémolyse, la conversion de la

biliverdine, l'immaturité des systèmes de captation et de conjugaison hépatique et une accentuation du cycle entérohépatique. L'exposition à la lumière bleue augmente la solubilité de la bilirubine, en permettant la production d'isomères ionisés solubles et favorise donc sa clairance d'élimination. Le mécanisme de photo-oxydation, plus lent n'est donc pas le mécanisme principal de cette technique[383].

L'efficacité de la photothérapie augmente en fonction de l'intensité lumineuse.

Les effets à long terme de la photothérapie néonatale sont peu décrits. Depuis le début des années 2000, plusieurs publications font état d'une augmentation du nombre de naevus et du nombre de naevus dysplasiques chez les enfants ayant eu une photothérapie néonatale. Les enfants qui ont eu une photothérapie néonatale pour traiter un ictère néonatal ont un risque significativement plus élevé de développer des naevus atypiques[384]. L'existence de naevus dysplasique est un autre facteur de risque de mélanome[385]. Récemment, Matichard *et al* rapportent l'augmentation du nombre de naevus significativement plus important chez les enfants ayant eu une photothérapie néonatale[386].

Les études sont contradictoires puisque Bauer *et al* n'observaient aucune différence significative du nombre de naevus entre les patients ayant eu un photothérapie néonatale et ceux n'en n'ayant pas eu sur une cohorte de 1812 patients[387,388]. Plus récemment, Mahé *et al* faisait le même constat dans une étude multicentrique[389]. Mais aucune étude n'a montré jusqu'à présent une augmentation du nombre de mélanome dans cette population.

B- Phototoxicité de la lumière bleue

La lumière bleue est à l'origine de nombreux effets biologiques et a fait l'objet de bon nombre d'études. Utilisée seule ou comme source lumineuse capable d'exciter des PS, elle a démontré des résultats prometteurs en cancérologie *in vitro* et *in vivo*. Elle est en effet capable d'induire la mort cellulaire par des mécanismes variables d'apoptose ou de nécrose, de moduler l'expression de certains gènes impliqués dans la progression tumorale.

Les effets biologiques des UV (290-380 nm) ont été largement étudiés en détail, en démontrant leur rôles dans les mutations de l'ADN à l'origine de certains cancers, des dommages oculaires (cataracte)[390] et le vieillissement cutané. A l'inverse, les effets biologiques de la lumière bleue sont moins bien élucidés[391]. Plusieurs études ont pu montrer des altérations du fonctionnement cellulaire comme par exemple des dysfonctionnements de certains facteurs de transcription[392]. Des altérations de l'ADN seraient dues à la production

d'espèces réactives de l'oxygène, probablement à l'origine des effets photobiologiques observés[393-395]. Ces ERO inhiberaient la croissance cellulaire en particulier sur les cellules à croissance rapide et l'activité mitochondriale[396]. Certaines cellules sont donc moins sensibles à la lumière bleue que d'autres et par ailleurs l'énergie modifie la réponse cellulaire[396]. La mitochondrie joue un rôle clé dans les mécanismes des effets biologiques de la lumière bleue. Cependant, il est difficile de connaître le retentissement des effets biologiques de la lumière bleue sur les tissus car l'environnement cellulaire semble jouer également un rôle dans le mécanisme de phototoxicité. En effet, des fibroblastes et des kératinocytes tumoraux humains exposées à la lumière bleue dans leur milieu de culture avaient une activité mitochondriale plus faible que les cellules exposées dans du PBS. Le rouge de phénol ne paraissait pas être le médiateur, mais la riboflavine pouvait être en cause, car elle est capable d'augmenter la production d'espèces réactives de l'oxygène (ERO)[397]. Les mitochondries contiennent des flavines capables d'absorber la lumière bleue (Fig-39)[398].

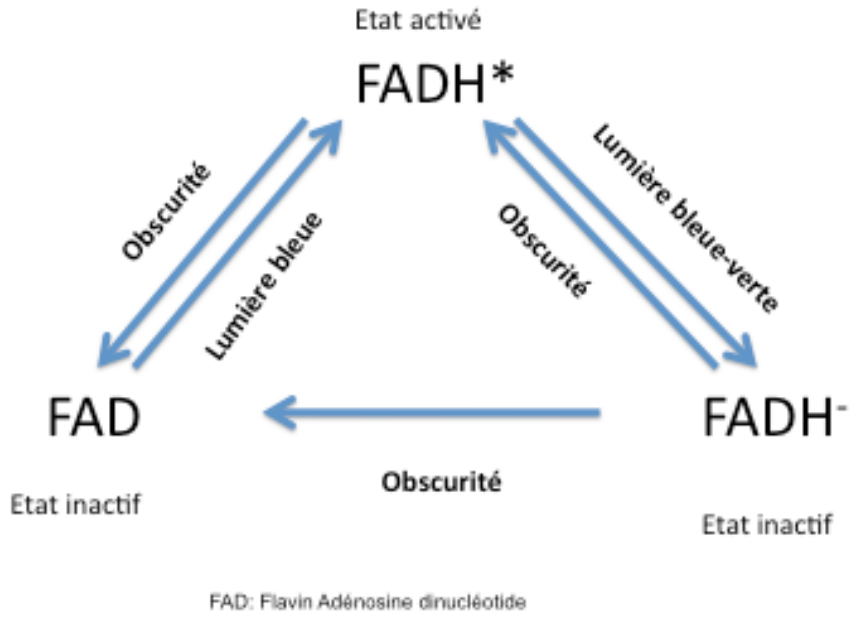


Figure 39 - Mécanisme d'activation utilisant la FAD : Photocycle de la flavine

Les premières études ont porté sur la toxicité de la lumière bleue sur l'œil. La lumière bleue en produisant des espèces réactives d'oxygène (ERO), serait à l'origine de la DMLA[399,400]. La génération des ROS lors d'exposition des cellules à la lumière serait liée à l'excitation de PS endogènes après absorption d'une longueur d'onde spécifique. Les maximums d'absorption de l'ADN et des protéines sont respectivement de 260 et 340 nm (le spectre des UV). La cible

de la lumière bleue serait située au sein de la mitochondrie et serait soit une porphyrine avec un pic d'absorption compris entre 410 et 440 nm (dans le spectre bleu), soit une flavine avec un pic à 450 nm[398]. Les effets biologiques de la lumière bleue pourraient être liés à la production d'ERO et à l'origine de phénomènes d'apoptose[401].

La propension des cellules de l'épithélium rétinien pigmentaire à être endommagées par l'exposition à la lumière visible, est liée à l'accumulation de lipofuscine. Ce pigment cellulaire brun-jaunâtre apparaît progressivement chez les personnes âgées[402]. Il est probable que l'existence de ce pigment soit un marqueur du vieillissement cellulaire mais aussi qu'il y contribue. La lipofuscine est capable de provoquer un effet photodynamique[403]. L'A2E (N-rétinyle-N-rétinylidène ethanolamine) est un constituant de la lipofuscine qui, activée, est capable de produire de l'oxygène singulet[404-406]. Ce fluophore contribue à l'autofluorescence de l'épithélium pigmenté rétinien. L'A2E est à l'origine de phénomènes d'apoptose et jouerait un rôle dans le développement de la DMLA[407]. Les cellules de l'épithélium pigmentaire rétinien contenant de l'A2E sont sensibles à la lumière bleue par rapport à celles qui en sont dépourvues et subissent des phénomènes apoptotiques[408,409]. La lumière bleue est capable d'augmenter l'expression de la caspase 3 au sein des cellules photoréceptrices de la rétine[410].

La photo-oxydation initiée par l'A2E, fluorophore rétinien peut être une des étapes aboutissant à l'altération des signaux cellulaires et à la modification de l'expression de certains gènes. Elle est à l'origine de l'augmentation de l'expression de RAGE et du VEGF[411]. Les cellules de l'épithélium rétinien pigmentaire contiennent de la mélanine, jouant le rôle de photoprotecteur. Le vieillissement est à l'origine d'une diminution de la production de la mélanine par ces cellules les rendant plus vulnérables aux phénomènes apoptotiques provoqués par la lumière bleue[412].

Le dépôt d'A2E au sein de l'épithélium pigmentaire rétinien par un défaut de transport provoque une dégénérescence des photorécepteurs. Elle est à l'origine d'une dystrophie maculaire héréditaire, causée par une mutation du gène ABCA4, de transmission autosomique récessive. Il s'agit de la maladie de Stargardt. Avec les modèles animaux, on a observé que la lumière bleue de l'A2E entraînait une apoptose de l'épithélium pigmentaire, une surproduction d'oxygène singulet avec la génération de corps époxides, capable d'induire des dommages à l'ADN (Fig-40).

A l'origine des DMLA, la lumière bleue est toxique pour les cellules rétiniennes. Elle peut provoquer l'augmentation du nombre de naevus mais provoque la destruction de cellules mélanocytaires tumorales. Ainsi, en fonction des intensités lumineuses, du moment et de la durée de l'illumination ainsi que l'environnement extracellulaire, les effets biologiques

observés peuvent être différents, contradictoires et parfois déconcertants. Ceci justifie la poursuite des études chez l'animal et chez l'homme afin de mieux cerner les mécanismes d'actions de la lumière bleue.

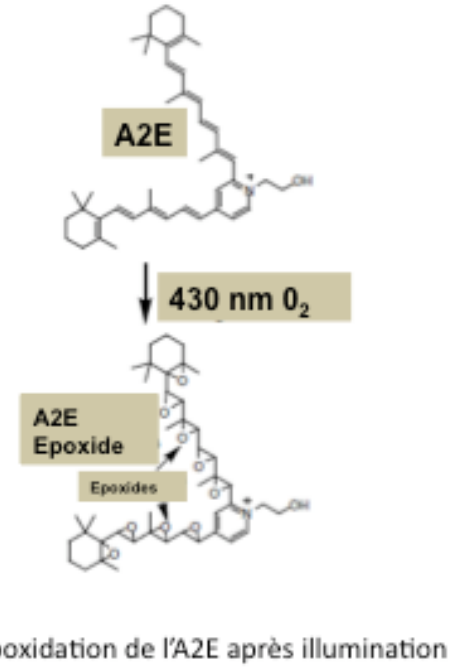


Figure 40 - Epoxidation de l'A2E après illumination

C- Le rôle de la lumière bleue et le mélanome choroïdien

Le mélanome choroïdien[8] représente la tumeur maligne intra-oculaire la plus fréquente chez l'adulte[413]. L'incidence varie de 4,3-10,9 cas/millions d'habitants. Cinquante pour cent des patients vont développer sur 10 à 15 ans des métastases hépatiques[414]. Cinq à 10 % des patients ont des naevus choroïdiens[415]. L'utilisation de filtre permettrait de prévenir la transformation maligne de ces naevus.

Plusieurs études ont suggéré que l'exposition à la lumière bleue pouvait jouer un rôle dans les processus de transformation maligne des mélanocytes en mélanocytes tumoraux[416]. Manning *et al* avaient démontré récemment que l'exposition de rat à la lumière bleue au long cours était à l'origine du développement de tumeur intra-oculaire[417]. D'autres facteurs de risque de

[8] Mélanome occulaire

mélanome choroïdien ont été identifiés en dehors de l'exposition à la lumière bleue : l'âge, la couleur de l'iris et de la peau du patient et l'exposition UV.

La lumière bleue était capable de produire des ERO dans le segment postérieur de l'œil à l'origine de dommages observés sur l'épithélium pigmentaire rétinien (EPR)[418]. Cette production d'ERO pourrait intervenir dans la physiopathologie de la DMLA [400].

In vitro, Marshall *et al* avaient démontré une augmentation de la croissance des mélanocytes choroïdiens humains lors d'exposition à la lumière bleue[416]. La même équipe montrait récemment que l'exposition à la lumière bleue influençait la progression des mélanomes choroïdiens sur des lapins albinos de Nouvelle-Zélande[419].

La proximité dans le spectre lumineux des UV et de la lumière bleue et de la proportion d'UV au sein d'une lumière visible bleue rend difficile l'imputabilité de la lumière bleue seule dans la progression tumorale et explique les publications contradictoires au sein de la littérature.

IV- But du travail

Les triglucosylporphyrines-RGD, porphyrine vectorisée de troisième génération, ont été synthétisées par le LSCN. Elles devraient se fixer avec sélectivité à la fois sur des cellules tumorales (mélanocytes tumoraux murins) et sur des cellules endothéliales. Le peptide RGD a été greffé sur une porphyrine enrichie de 3 résidus glucidiques pour augmenter l'affinité envers les cellules cancéreuses. La détermination des doses efficaces phototoxiques mais non cytotoxiques en l'absence de lumière *in vitro* sur des lignées cellulaires tumorales et la comparaison de leur efficacité avec la porphyrine de référence, le Photofrin® sera l'objet de la première partie du travail. Deux sources lumineuses, une lumière rouge et une lumière bleue ont été utilisées pour l'activation de la porphyrine de synthèse. Les différences d'efficacité ont été étudiées.

L'observation de la phototoxicité de la lumière bleue a conduit à tenter d'élucider les mécanismes d'action pouvant aboutir à la destruction de mélanocytes tumoraux murins (B16F10) et de cellules endothéliales bovines (EJG).

La mort cellulaire survenant au cours de la PTD est liée souvent à des phénomènes d'apoptose, parfois de nécrose. Mais, l'autophagie pourrait être un mécanisme observé au cours de la PTD et fera l'objet du travail de la dernière partie.

Chapitre II. Synthèse de Mono-triglucosylporphyrines-RGD

A-Introduction

Le développement des tumeurs est largement conditionné par l'élaboration concomitante d'une trame vasculaire, ou néo-angiogenèse, qui apporte aux cellules tumorales les éléments nécessaires à leur survie. De récents travaux ont confirmé expérimentalement que la néo-angiogenèse favorise le développement tumoral. En outre, elle participerait à la dissémination métastatique : lorsque l'environnement de la tumeur primaire est très vascularisé, la probabilité de voir apparaître des métastases est élevée, et le pronostic peu favorable. L'ensemble de ces faits justifie l'intérêt porté pour la synthèse de nouvelles molécules toxiques capables de cibler spécifiquement la néovascularisation afin de la détruire.

B-Principe et schéma général de la synthèse

La synthèse de nouvelles porphyrines glycosylées peptidiques pourraient constituer un développement important dans la stratégie de la photothérapie des cancers. En effet, les cellules tumorales et les cellules endothéliales constitutives des vaisseaux sanguins irriguant les tumeurs sont enrichies en intégrines $\alpha_v\beta_3$, glycoprotéines transmembranaires en partie intégrées aux membranes plasmiques. Les intégrines sont capables de lier leurs ligands spécifiques, principalement les protéines matricielles (fibronectine, vitronectine), par l'intermédiaire de la séquence peptidique Arginine-Glycine-Acide Aspartique (RGD). Les unités osidiques reconnues par des glycoproteines membranaires (lectines) sont surexprimées à la surface de certaines cellules cancéreuses[209]. De plus, la présence d'une ou plusieurs unités glucidiques accroît l'hydrophilie du principe actif et leur position joue un rôle dans l'activité photobiologique[205]. Il semble que les formes triglycosylées aient une activité supérieure aux formes tétraglycoconjuguées[206,420,421]. Le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de l'Université de Limoges, a conçu un grand nombre de porphyrines glycosylées ayant la propriété de se fixer préférentiellement sur les lectines membranaires. La richesse attestée de certaines cellules cancéreuses en lectine a justifié cette orientation. Plus récemment, le laboratoire a synthétisé deux nouvelles variétés de porphyrines, porphyrine-

polyamine et porphyrine-RGD[422]. Ceci a fait l'objet du travail de thèse de Vincent Chaleix. Nous proposons de reprendre ces travaux de synthèse pour pouvoir disposer des substrats nécessaires en quantité suffisante.

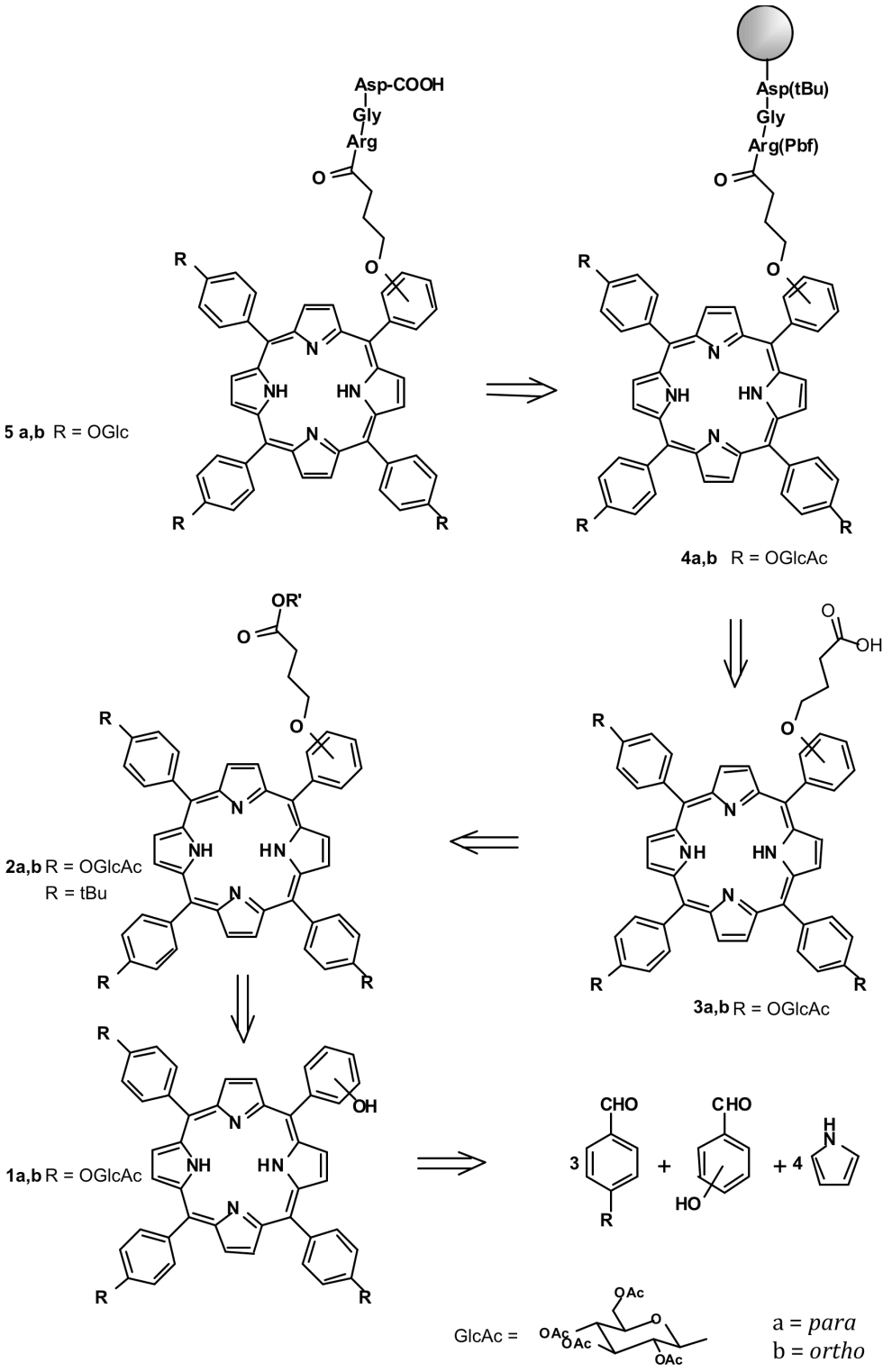


Figure 41-Schéma rétrosynthétique de la porphyrine 5a,b

Les différentes étapes de synthèses de ces composés sont représentées sur le schéma rétrosynthétique de la figure 41. Les synthons clefs sont des hydroxyphénylporphyrines *ortho* et *para* formées par condensation de pyrrole sur les aldéhydes appropriés. Après fixation d'une chaîne alkyle portant une fonction acide carboxylique, les porphyrines obtenues sont couplées au peptide RGD fixé sur résine et dont les fonctions latérales sont convenablement protégées. Les composés finaux sont isolés par décrochage du support et déprotection simultanée des fonctions protégées des acides aminés.

C-Discussion

Le LCSN s'est intéressé dans un premier temps à la synthèse et à la caractérisation structurale des porphyrines **5a,b** (Fig-42). Ces composés sont des *méso*-triglucosylporphyrines portant la séquence peptidique RGD linéaire lié au macrocycle par l'intermédiaire d'une chaîne alkyle placée en position *ortho* ou *para* du groupement phényl[423]

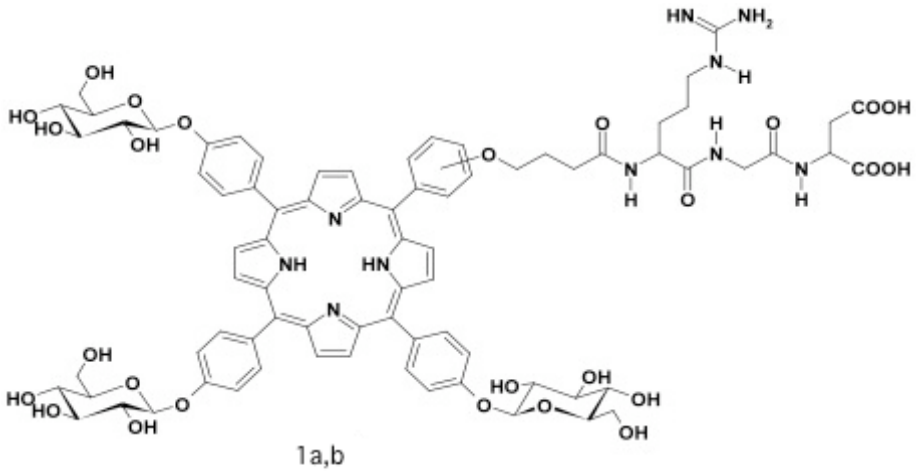


Figure 42-Structure des méso triglucosylporphyrines mono RGD 5 a (en position para), b (en position ortho)

La stratégie générale d'obtention de ces composés consiste dans un premier temps à synthétiser une porphyrine glycosylée portant une fonction acide carboxylique à l'extrémité d'une chaîne carbonée. Dans un 2ème temps, elle est condensée en phase solide, sur le peptide RGD greffé sur résine Wang, en utilisant les réactifs de synthèse peptique tel que le DCC/HOBt. Le clivage de la résine et des groupements protecteurs a lieu en milieu TFA/CH_2Cl_2 en présence d'anisole. Une étape supplémentaire est ensuite nécessaire afin de déacétyler les unités glucidiques.

Nous nous proposons tout d'abord de faire un bref rappel de l'intérêt de la synthèse peptidique en phase solide.

Dans les années 60, Merrifield et *al* ont posé les bases de la stratégie de synthèse peptidique en phase solide[424]. Si le principe général de la méthode est depuis resté le même, de très nombreuses améliorations techniques ont été apportées la rendant particulièrement efficace et attractive. Rappelons que la construction itérative d'un peptide sur support solide commence par la déprotection de la fonction amine terminale du peptide en croissance puis l'addition de l'acide aminé activé suivant, conduisant à un peptide protégé augmenté d'une unité, prêt pour

un nouveau cycle. La synthèse peptidique en solution, qui implique la purification et la caractérisation de chacun des intermédiaires, est très fastidieuse. La force de la synthèse sur support solide réside dans le fait qu'à la fin de chaque cycle, un simple lavage de la résine suffit à éliminer l'ensemble des réactifs qui n'ont pas réagi.

L'activation classique d'un acide aminé consiste à remplacer l'hydrogène de la fonction acide carboxylique par un bon groupe partant[9]. Pour cela, de nombreuses solutions ont été apportées, les plus courantes étant l'utilisation d'esters actifs ou l'utilisation d'anhydrides symétriques. En effet, l'activation peut avoir lieu *in situ* en présence d'un carbodiimide comme le dicyclohexylcarbodiimide (DCC) ou le diisopropylcarbodiimide (DIC) ce qui conduit à la formation de l'anhydride symétrique correspondant. Le DIC est généralement préféré au DCC car l'urée secondaire formée à partir de ce dernier est peu ou pas soluble dans les solvants classiquement utilisés.

L'utilisation de divers esters actifs dérivés du *para*-nitrophénol, du 2,4,5-trichlorophénol ou du pentafluorophénol est également courante. Les esters pentafluorophénoliques, introduits à l'origine par Kisfaludy en synthèse de peptides en solution, sont très réactifs et, en présence de 1-hydroxybenzotriazole (HOBt), ont une réactivité qui approche celle des anhydrides symétriques. Il en est de même pour les esters de 3,4-dihydro-3-hydroxy-4-oxo-benzotriazine (DHBt) [425]. Les esters très réactifs du HOBt peuvent quant à eux être formés *in situ* soit en passant par l'intermédiaire de l'anhydride symétrique formé à partir d'un carbodiimide en utilisant le réactif de Castro (hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yloxy-tri-(dimethylamino)phosphonium ou BOP)[426]. Parce que l'utilisation de ce dernier se révèle très toxique, il est peu à peu remplacé par l'hexafluorophosphate de benzotriazole-1-yloxy-tripyrrolidino-phosphonium ou PyBOP® sans aucune perte d'activité[427]. Ce type d'esters peut également être obtenu par l'action d'hexafluorophosphate d'uronium comme l'hexafluorophosphate de 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium (TBTu) plus connu sous le nom de réactif de Knorr [428].

Afin d'utiliser cette méthodologie, pour la réalisation de la synthèse de porphyrines glucosylées à motif RGD, le LCSN a, tout d'abord, effectuée la synthèse des *ortho* ou *para* monohydroxyphenyltriglycosylporphyrine par la méthode de Lindsey.

La méthode présentée par Lindsey a surtout été développée pour la synthèse des porphyrines symétriques [429]. Les rendements observés varient généralement de 25% à 30%.

[9] groupe facile à faire partir et libère ainsi une nouvelle fonction

Néanmoins, elle peut être également avantageusement utilisée dans le cas de certaines porphyrines non symétriques. Cette réaction s'effectue "one pot" en deux étapes (Fig-43). Dans un premier temps, le pyrrole fraîchement distillé (4 éq.), l'*ortho* ou le *para*-hydroxybenzaldéhyde (1 éq.) et le 4-(2',3',4',6'tétra-*O*-acétyl-β-D-glucopyranosyloxy)-benzaldéhyde (3 éq.) sont mis à réagir dans le dichlorométhane rigoureusement anhydre et sous courant d'argon en présence d'un catalyseur acide, le BF_3OEt_2. Au bout d'une heure, les porphyrinogènes formés sont oxydés par addition de *para*-chloranile. Après évaporation du solvant, les porphyrines formées sont purifiées suivant le même protocole que celui décrit précédemment. Les rendements sont alors de 12% pour le composé **1a** et de 8% pour le composé **1b.**

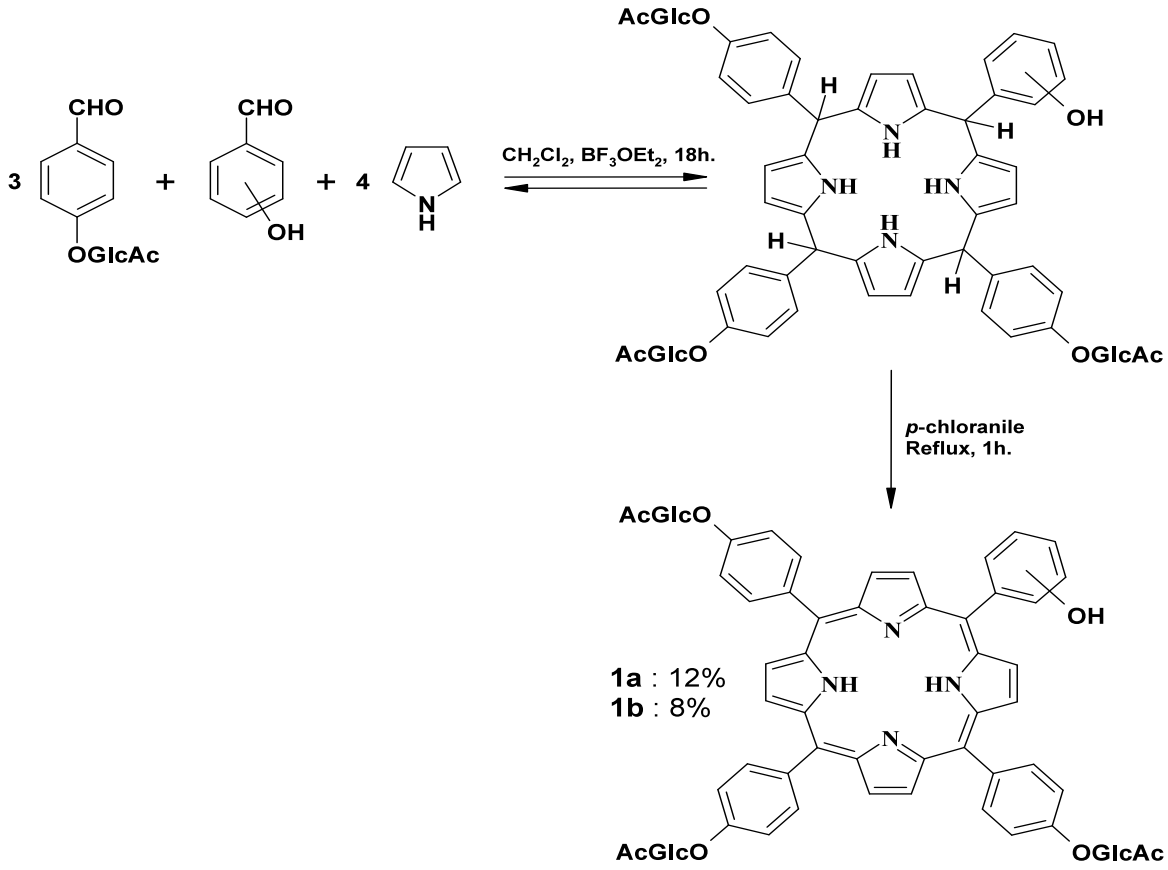


Figure 43- Synthèse des mésohydroxyphényltriglucosylporphyrine 1 a, b selon Lindsey

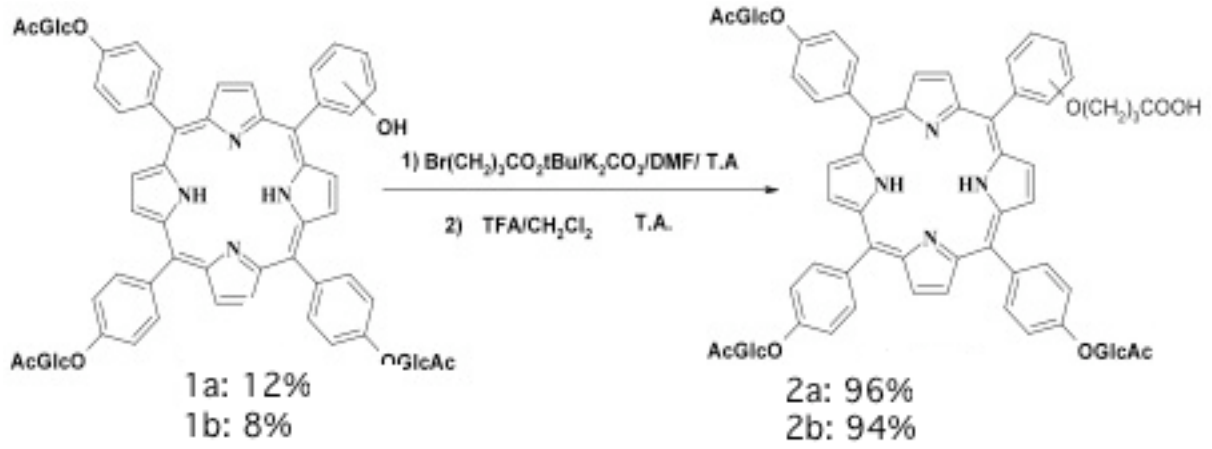


Figure 44- Synthèse des monocarboxyphenyltriglucosylporphyrines (a, en position para, b en position ortho)

Puis, nous avons fait réagir le 4-bromobutanoate de *tertio*butyle avec les porphyrines **1 a,b** dans le diméthylformamide à température ambiante en présence de carbonate de potassium (Fig-44). Les glucosylporphyrines estérifiées obtenues sont alors mises à réagir, à température ambiante, dans un mélange de dichlorométhane et d'acide trifluoroacétique (8/2 v/v). Dans tous les cas, le produit de départ est entièrement hydrolysé après 2 heures de réaction et nous n'avons observé, dans ces conditions, aucune dégradation des porphyrines. Après traitement et purification par chromatographie sur colonne de silice, les rendements obtenus sont de 96% et de 94% pour les composés **2a** et **2b** respectivement (Fig-44).

Ces composés possédant une fonction acide carboxylique libre sont ensuite condensés à la fonction amine primaire de l'arginine du tripeptide RGD (Arginine-Glycine-Acide Aspartique) protégé et préalablement fixé sur une résine Wang (coté acide aspartique) (Fig-45). Le décrochage des porphyrines peptidiques s'effectue en milieu acide, par réaction de l'acide trifluoroacétique. En effet, la liaison ester entre l'unité peptidique et le polymère constituant le support est très sensible à l'hydrolyse acide par le TFA. De plus, dans ces conditions, les groupements protecteurs de l'arginine (PBf) et de l'acide aspartique (tBu) sont particulièrement labiles. La déprotection des unités osidiques a ensuite lieu, comme précédemment décrit, en présence de méthanolate de sodium.

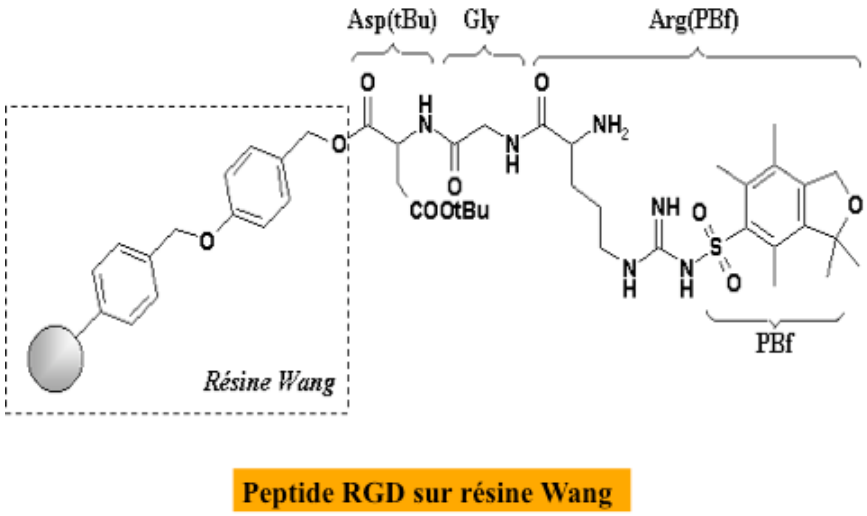


Figure 45 - Peptide RGD sur la résine de Wang

D-Caractérisation

1. Spectroscopie UV visible

Les spectres des composés **5a** et **5b** ont quant à eux été réalisés dans l'eau. Les résultats sont rassemblés dans le tableau 3. Comme dans le cas des précurseurs étudiés précédemment, ils correspondent tous aux spectres généralement attendus pour les *méso*-porphyrines bases libres. Ils présentent une forte bande d'absorption vers 420 nm (bande de Soret) et 4 autres bandes d'intensité plus faible vers 650, 590, 550 et 520 nm notées respectivement I, II, III et IV.

Tableau 3 : Spectre UV-Visible des porphyrines 1a,b.

composés	Solvant	Soret	IV	III	II	I
5a	H_2O	417 (282,7)	518 (6,3)	553 (5,8)	593 (4,0)	646 (3,2)
5b	H_2O	417 (216,3)	524 (5,9)	561 (5,9)	594 (3,2)	650 (2,5)

l_{max} (nm) [coefficient d'absorption (ex10^{-3} $mol^{-1}.L.cm^{-1}$)], à 20°C

Cependant, nous avons constaté que les spectres des triglucosylporphyrines, complètement déprotégées, **5 a,b** subissent d'importantes modifications en fonction de la concentration. En effet, nous avons observé dans les deux cas une diminution de l'absorption pour des mesures

effectuées à des concentrations relativement importantes ou, en d'autres termes, un comportement qui ne suit plus la loi classique de Beer-Lamber.

L'élargissement de la bande de Soret associé à une diminution de son coefficient d'absorption et d'un déplacement vers le bleu ou vers le rouge peut être interprété par la formation d'agrégats. Conformément au modèle de l'exciton, un déplacement vers les faibles longueurs d'onde indique des interactions de type « face-to-face »[10] (cas du composé **5a**) alors qu'un déplacement vers les grandes longueurs d'ondes suggère la formation d'agrégats de type « edge-to-edge »[11] (cas du composé **5b**)[430,431].

2. Spectrométrie de masse

Nous avons poursuivi l'analyse structurale des porphyrines peptidiques **5 a,b** par spectroscopie de masse MALDI. Comme dans le cas des précurseurs, seul le pic quasi moléculaire[12] $[M+H]^+$ est observé. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Spectrométrie de masse MALDI.

composés	Masse moléculaire calculée (uma)	Masse de l'ion quasi-moléculaire observé (uma)
5a	1578,5	1579,7
5b	1578,5	1579,7

Le LCSN a également effectué pour les composés **5 a,b** une analyse par Spectrométrie de Masse Haute Résolution dans le but de confirmer les structures de ces composés par la détermination de leur formule brute sans aucune ambiguïté. Les spectres ont été réalisés au Centre Régional de Mesures Physiques de l'Ouest (CRMPO) situé à Rennes à l'aide d'un spectromètre de masse ZABSpec. TOF de Micromass possédant une géométrie EBE TOF (Secteurs magnétique et électrique avec Temps de Vol orthogonal).

[10] Empilement des porphyrines l'une sur l'autre

[11] Positionnement côte à côte

[12] Masse moléculaire du composé + 1

Les résultats obtenus sont reportés dans le tableau 5. Dans tous les cas, ils confirment la formule brute attendue. Nous présentons figure 46 à titre d'exemple, le spectre obtenu pour le composé **5a.**

Tableau 5 : Spectrométrie de Masse Haute Résolution.

Composés	Masse moléculaire calculée (uma)	Masse de l'ion quasi-moléculaire observé (uma)
5a	Calculée pour $C_{78}H_{86}N_{10}O_{26}$ m/z = 1578,5713	1601,5627 $[M+Na]^+$ ($C_{78}H_{86}N_{10}O_{26}Na$, $m/z_{théo}$ = 1601,5612)
5b	Calculée pour $C_{78}H_{86}N_{10}O_{26}$ m/z = 1578,5713	1601,5650 $[M+Na]^+$ ($C_{78}H_{86}N_{10}O_{26}Na$, $m/z_{théo}$ = 1601,5612)

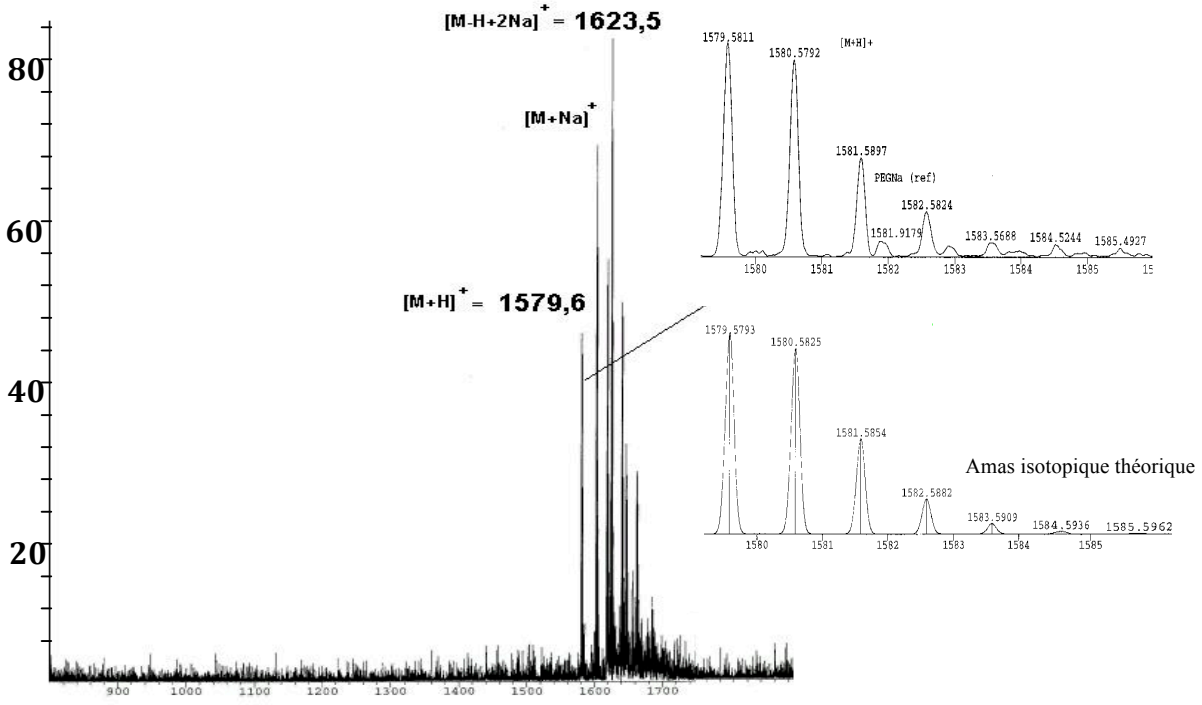
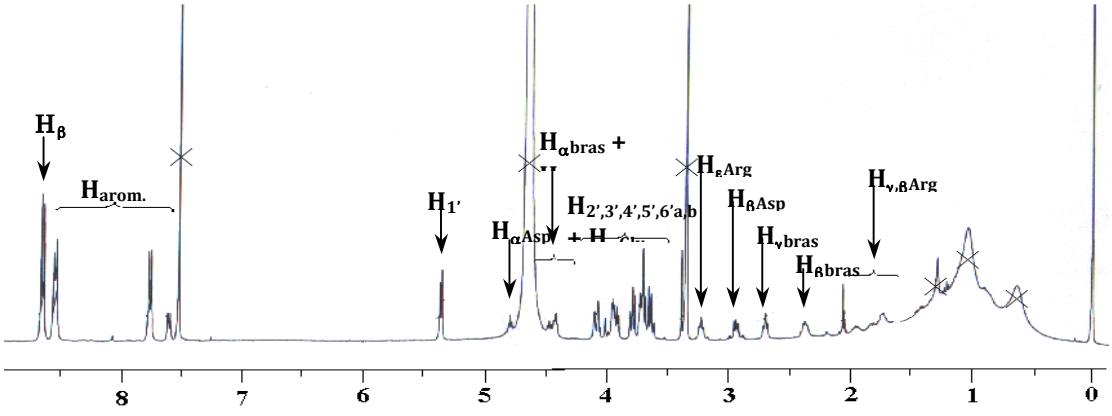


Figure 46 - Spectre de masse haute résolution du composé 5a.

3. Spectroscopie RMN

Compte tenu de l'aptitude des porphyrines à motif peptidique déprotégé[13] à s'auto-associer en solution, il nous a été particulièrement difficile de réaliser leurs spectres de RMN ^{1}H. En ce qui concerne les porphyrines peptidiques glycosylées **5 a,b**, les spectres obtenus dans des solvants variés montrent des signaux très déformés et fortement élargis pour lesquels il nous été impossible d'assigner sans ambiguïté chaque proton des molécules. Toutefois, dans tous les cas, l'étude de la courbe d'intégration indique le bon nombre de protons. Bien que ce résultat soit couramment rencontré pour ce type de composés, nous avons tenté d'améliorer la résolution des spectres en effectuant plusieurs essais pour lesquels nous avons fait varier la nature du solvant mais aussi la température ou encore la concentration. Les meilleurs résultats pour les porphyrines **5a** et **5b** ont été obtenus en les solubilisant dans un mélange de $CDCl_3$/ CD_3OD (50/50) contenant 5 équivalents molaires d'acide trifluoroacétique par porphyrine. En effet, il a déjà été observé que, sous leur forme diprotonée, les macrocycles tétrapyrroliques présentent une plus faible aptitude à l'agrégation. L'attribution de l'ensemble des signaux a été effectuée grâce à l'étude des courbes d'intégration et des spectres de corrélation 2D proton-proton (COSY). Ils confirment la structures des deux porphyrines glycosylées portant la séquence RGD (Fig-47)

Figure 47 - Spectre RMN ^{1}H du composé 5a.



[13] Le but d'une protection est de préserver une fonction intacte. Ainsi, en protégeant une fonction on la préserve en l'empêchant de réagir. La fonction ainsi protégée n'est plus la fonction d'origine, elle ne réagit donc plus de la même façon vis-à-vis des différents réactifs. Il est alors possible de protéger une fonction réactive de façon de

E-Conclusion

Les porphyrines de synthèse triglucosyl-RGD ainsi synthétisées ont ensuite été évaluées sur des lignées de mélanocytes tumoraux murins et des cellules endothéliales bovines. Ces travaux ont permis un travail collaboratif entre le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de l'Université de Limoges, le Service de Dermatologie du CHU, et les deux équipes accueils 4021 de Biochimie et génétique moléculaire et 3842 d'homéostasie cellulaire er Pathologies.

faire de nombreuses étapes d'aménagement fonctionnel sur d'autres parties de la molécule. Puis, lors d'une ultime étape de déprotection on récupère la fonction protégée précédemment.

Chapitre III. Evaluation biologique des TGP-RGD sur deux lignées cellulaires

A-Introduction

Nous avons d'abord évalué la cytotoxicité et la photocytoxicité des triglucosylporphyrines-RGD (TG-RGD) sur des lignées tumorales mélanocytaires murines (B16F10) et sur des cellules endothéliales capillaires bovines (EJG). Les porphyrines de synthèse ont été comparées à la molécules PS de référence le Photofrin®. De plus, nous avons recherché si la signalisation induite correspondait à l'apoptose ou la nécrose. La greffe du résidu peptidique RGD permettant une meilleure sélectivité sur les néovaisseaux et les cellules tumorales en se fixant sur une intégrine de surface, nous a conduit à tenter de localiser la porphyrine *in vitro* et d'optimiser l'efficacité en déterminant le meilleur temps d'incubation.

1. Les porphyrines à motifs RGD

Les porphyrines-RGD synthétisées par le LCSN, sont des porphyrines possédant une bonne hydrosolubilité grâce aux groupements glucidiques et une excellente sélectivité pour les vaisseaux tumoraux grâce au motif RGD (argine-glycine-acide aspartique) (Fig-48). La masse molaire de la porphyrine TG-RGD ortho et para est de 1578,5 ; celle de TG-RGDp sans le motif est de 1712,504.

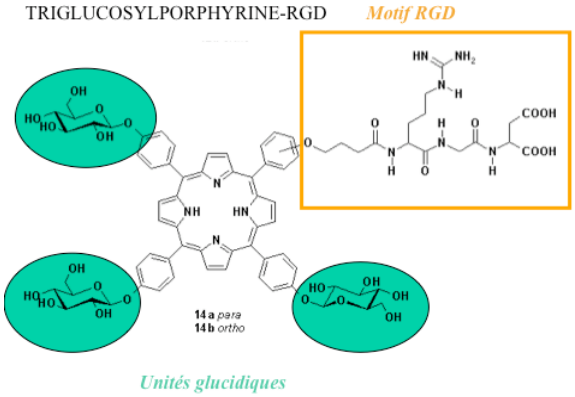


Figure 48 - Structure de la Triglucosylporphyrine-RGD

Les deux isoformes ortho et para-triglucosylporphyrine-RGD ont une activité photodynamique démontrée plus importante que le Photofrin® sur la lignée promyélocytaire humaine multipotente K562 (Fig-49).

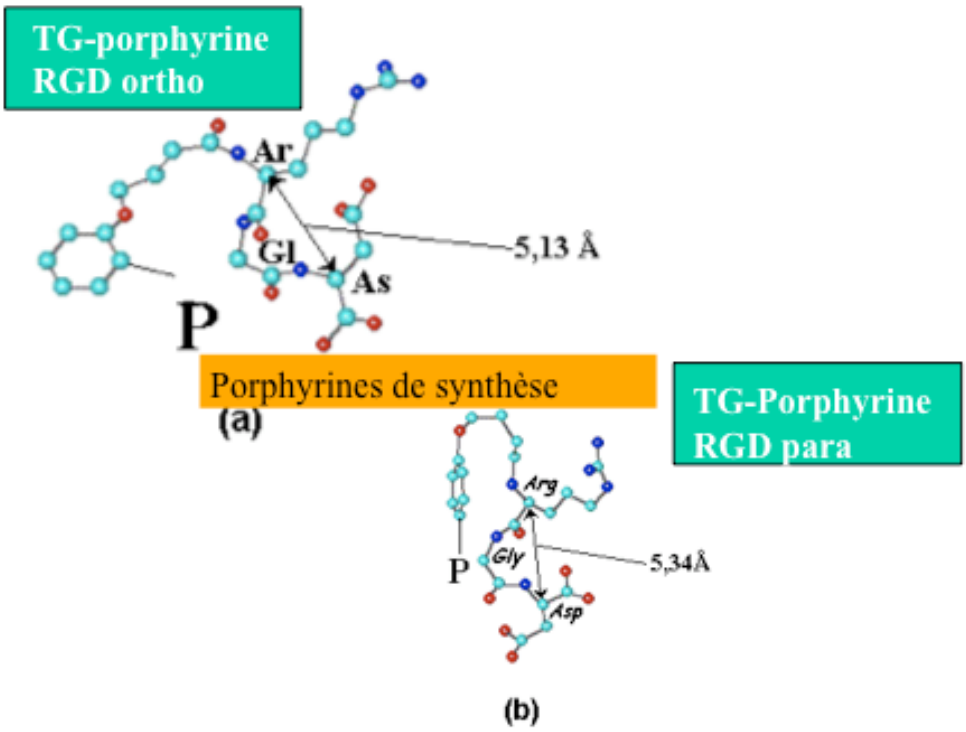


Figure 49- Porphyrine de synthèse triglucosylporphyrines RGD para ou ortho.

Ces porphyrines de synthèse représentent un double intérêt en cancérologie. Elles sont enrichies en unités glucidiques, ce qui favorise leur hydrosolubilité, leur transport vers la tumeur mais aussi augmente leur affinité pour les cellules cancéreuses, leur pénétration et leur rétention au sein du tissu tumoral. En effet, les cellules tumorales sont naturellement riches en récepteurs glucidiques spécifiques, les lectines membranaires[209]. La présence du motif RGD augmente la sélectivité de la porphyrine pour les cellules cancéreuses et les néovaisseaux irrigant la tumeur.

Les intégrines sont des récepteurs glycoprotéiques hétérodimériques transmembranaires. Elles sont capable de créer des interconnections cellules-cellules et cellules-matrice extra-cellulaire. Leur domaine extra-membranaire interagit avec de nombreux ligands dont des glycoprotéines de la matrice extra-cellulaire (MEC). Leur domaine intra-cellulaire est lié au cytosquelette cellulaire via différentes protéines[432,433]. Les intégrines sont composées de 2 sous-unités α et β. A ce jour, 18 sous-unités α et 8 β ont été identifiées[434].

L'intégrine $\alpha_V\beta_3$ est fortement exprimée par les cellules endothéliales de la néovascularisation. Elle est capable de se fixer aux protéines de la matrice extra-cellulaire en reconnaissant la séquence RGD, retrouvée dans de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire (vitronectine, fibrinogène, ostéopontine) et dans la fibronectine (Fig-50)[435]. Cette séquence est aussi reconnue par d'autres intégrines ($\alpha_V\beta_1$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, etc...). Ces protéines sont impliquées dans les processus d'angiogénèse, de différenciation, de croissance tumorale et de migration des cellules tumorales[10,423]. En se liant à un ligand spécifique, elles sont capables d'activer la cascade des MAPK (Mitogen Activated Proteins Kinase)[436].

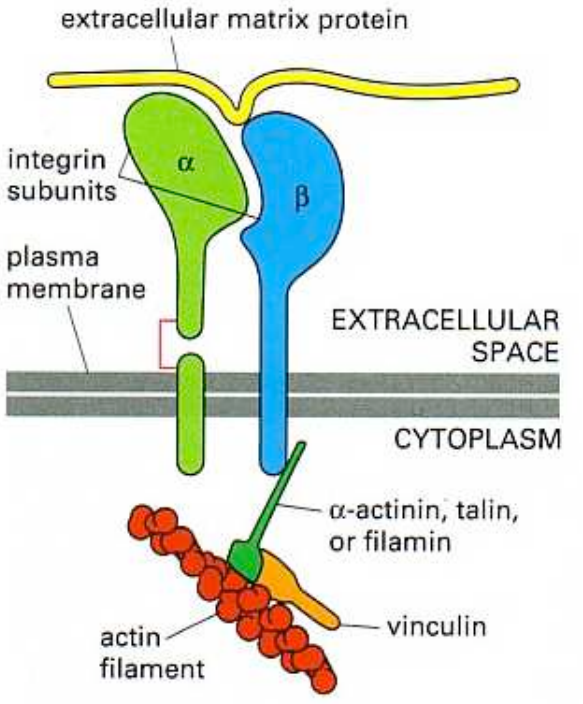


Figure 50 - Structure d'une intégrine

Les mélanocytes tumoraux expriment à leur surface les intégrines $\alpha_V\beta_3$. A l'inverse, l'expression de cette intégrine est réduite au sein des tissus normaux en dehors de l'ostéoclaste[437].

Les peptides contenant la séquence RGD sont utilisés pour cibler préférentiellement l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ des néovaisseaux[438]. Des formes dicycliques ont été développées pour véhiculer des substances en chimiothérapie[210].

2. La mort cellulaire

Actuellement, on distingue deux grands types de mort : la nécrose ou l'apoptose. Toutefois, la distinction entre les deux n'est pas toujours aussi tranchée comme cela a été souvent décrit. Récemment, ont été décrite des formes de mort qui s'apparentent pour certains aspects plus à de l'apoptose et pour d'autres, plus à de la nécrose.

a) La nécrose

A l'inverse de l'apoptose qui est un processus actif et contrôlé, la nécrose correspond classiquement à une mort passive, accidentelle et pathologique. La nécrose est la conséquence d'une lésion initiale provoquée par un agent physique ou chimique qui traumatise l'environnement cellulaire. Elle se produit en cas d'hypoxie sévère, de privation de glucose, d'exposition à des toxines, des agents physique ou chimique, et des variations de température ou de pH.

Au plan morphologique, la cellule nécrotique présente des caractéristiques bien différentes de celles que l'on peut rencontrer dans la cellule en apoptose. On peut observer un gonflement cellulaire transiyoire du notamment aux mitochondries, à des renflements membranaires, et à une fragmentation de la chromatine nucléaire. Il s'en suit une lyse cellulaire avec un relargage du contenu cellulaire dans le milieu extra-cellulaire, en particulier des médiateurs lipidiques de l'inflammation, cytokines et protéases induisant *in vivo* un processus inflammatoire[439](Fig-51).

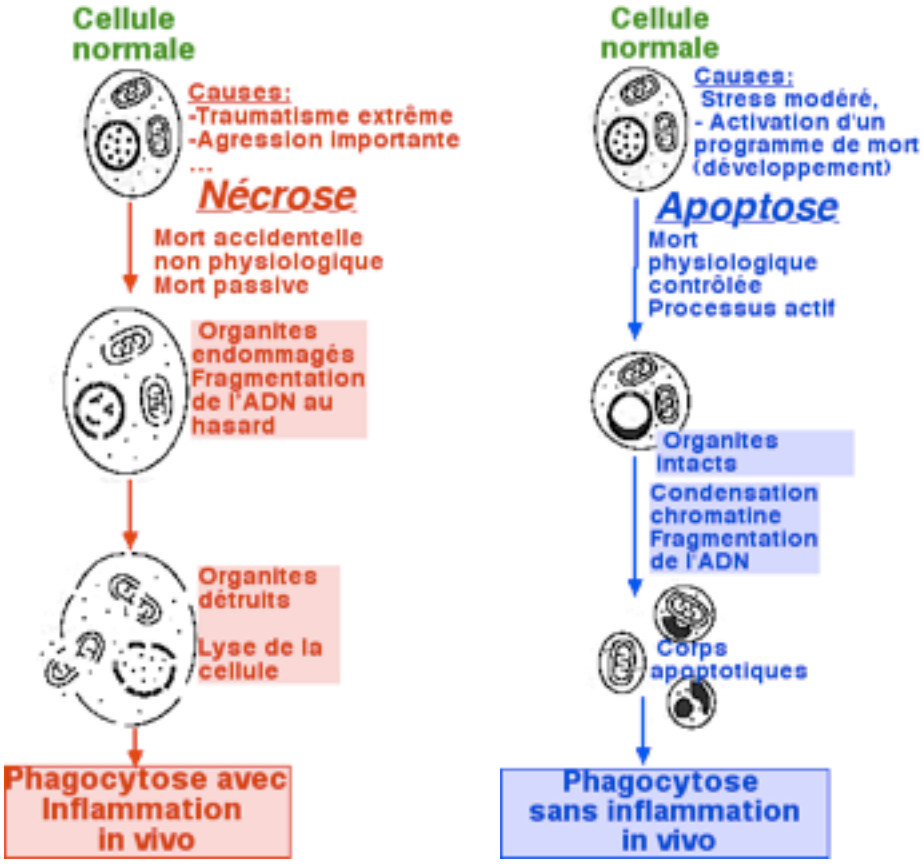


Figure 51 - Représentation schématique des modifications morphologiques cellulaires au cours de l'apoptose et de la nécrose.

b) L'apoptose

L'apoptose, décrite comme une mort cellulaire « contrôlée », est par conséquent, un processus actif à l'inverse de la nécrose. La cellule s'engage dans un processus d'autodestruction pour maintenir l'homéostasie de l'organe concerné. Dans un tissu, la cellule apoptotique commence par perdre contact avec les cellules avoisinantes, puis le volume cellulaire subit une forte réduction. Au cours de l'apoptose, la chromatine devenue dense s'agrège en amas en périphérie du noyau. Elle se fragmente en oligonucléosomes puis en nucléosomes. A son tour, le cytoplasme se condense. Des digitations des membranes nucléaires et cytoplasmiques aboutissent à la création des corps apoptotiques contenant du matériel nucléaire et des organites intacts. La membrane plasmique ne se rompt pas, mais son organisation lipidique est bouleversée. D'une part, l'asymétrie de la phosphatidylsérine est perdue. En effet, elle est normalement maintenue sur le feuillet interne grâce à des translocases ATP-dépendantes (flippases réalisant une réaction de « flip-flop »). A l'inverse, la sphingomyéline présente sur le feuillet externe (grâce au même mécanisme) devient

présente ensuite sur les deux feuillets de la membrane plasmique. Ainsi, le maintien de l'intégrité membranaire évite le relargage vers le milieu extra-cellulaire des constituants toxiques intra-cellulaires. Ceci explique l'absence de réaction inflammatoire *in vivo* contrairement à celle rencontrée au cours du phénomène de nécrose.

Au cours de l'apoptose, la mitochondrie joue un rôle essentiel en subissant des modifications importantes[440]. Une chute du potentiel transmembranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_{mt}$) est concomitante de l'ouverture d'un canal à forte conductance, le pore de transition de perméabilité[441]. Ce canal permet la pénétration d'eau et d'électrolytes au sein de la mitochondrie, provoquant son gonflement et la rupture de la membrane externe mitochondriale, favorisant le relargage cytoplasmique du cytochrome c[442,443].

Les cellules et les corps apoptotiques finissent par être lysés *in vitro* au cours d'une nécrose dite « secondaire » [444] (Fig-51).

3. Les effecteurs moléculaires de l'apoptose

a) Les Caspases

Les caspases (**C**ysteine-containing **ASP**artate-specific prote**ASE**) sont des protéases possédant une cystéine dans leur site catalytique dans le motif QACxG. Elles sont capables de cliver leurs substrats spécifiquement après un résidu aspartate[445]. Elles sont présentes dans le cytoplasme sous forme de pro-caspases inactives. Deux clivages au niveau de 2 aspartates (ASP), une hétérodimérisation d'une petite sous-unité et d'une grande, puis une homodimérisation vont aboutir à une caspase active. De plus, certaines d'entre elles sont capables d'activer d'autres pro-caspases en déclenchant une cascade d'activation (Fig-52).
Les pro-caspases possèdent un prodomaine N-terminal de taille variable, un domaine qui deviendra après clivage une grande sous unité (17-21 kDa) et un domaine qui donnera naissance à la petite sous unité (10-14 kDa).

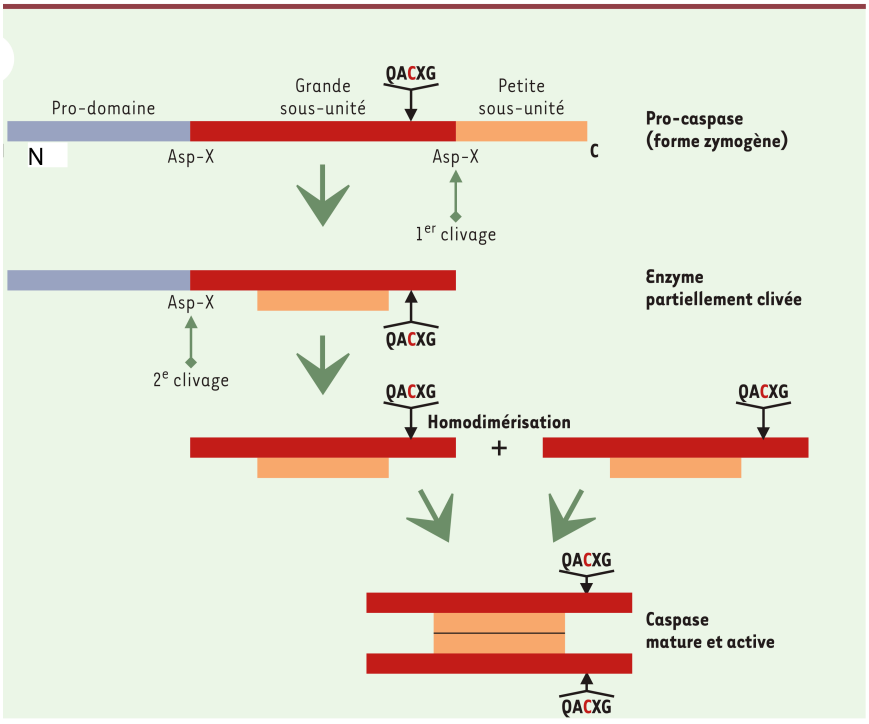


Figure 52 - Schéma d'activation des caspases [446]

Les caspases sont classées en 3 catégories suivant qu'elles interviennent au cours des processus inflammatoires, au cours de la phase initiatrice de l'apoptose ou de la phase

effectrice (Fig-53). Les caspases initiatrices possèdent un pro-domaine long contenant des motifs d'interactions protéine-protéine. Il s'agit des domaines Death effector Domain (DED) pour les caspases -8 et -10, et du domaine CAspase Recruitement Domain (CARD) pour les caspases -1, -2, -4 et -9. Ils servent à leur activation et leur permettent d'activer les caspases effectrices [447]. La caspase -14 intervient dans la différenciation terminale des kératinocytes [448].

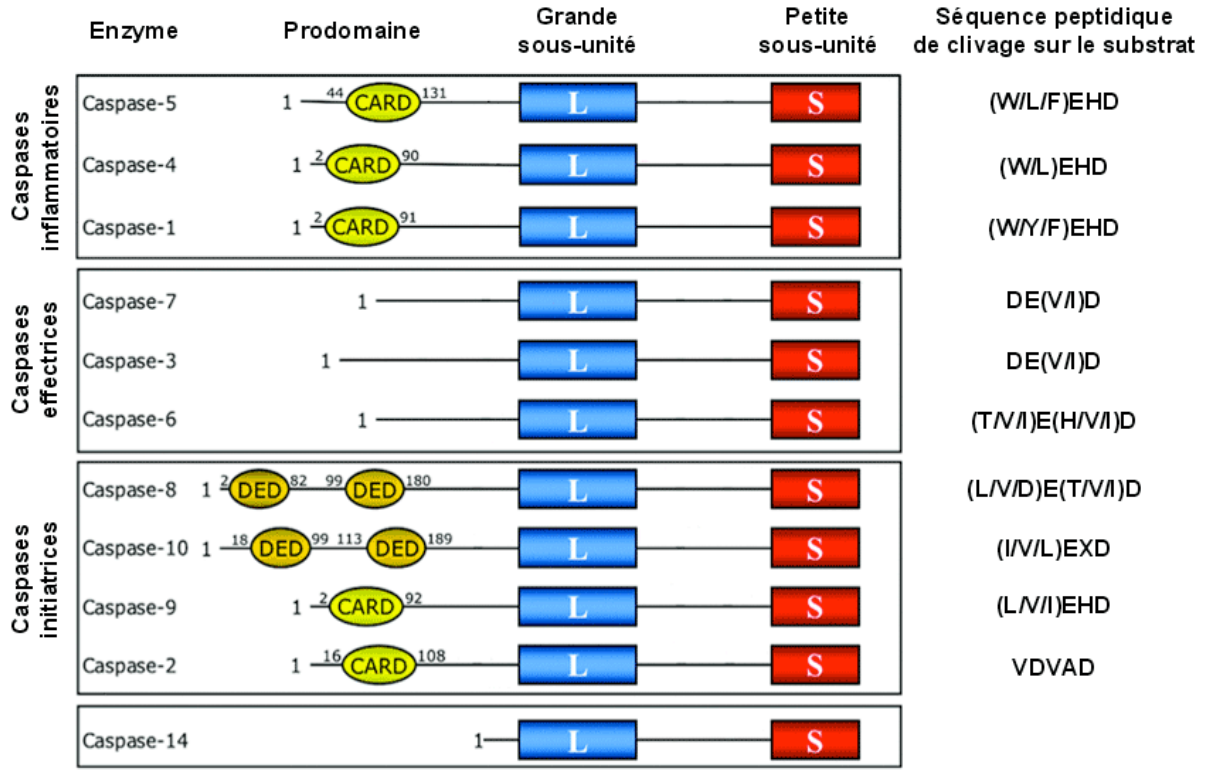


Figure 53 - Les différentes classes de caspases humaines [449]

Les caspases -1, -4, -5 jouent un rôle dans la réponse inflammatoire en activant des cytokines pro-inflammatoires IL-1β et IL-18. Si ce groupe de caspases ne semble jouer aucun rôle dans l'apoptose, les caspases initiatrices et effectrices sont essentielles pour les phénomènes apoptotiques.

L'Apaf-1 (Apoptotic peptidase activating factor 1) est un adaptateur moléculaire essentiel pour assurer l'activité de certaines caspases effectrices. Lors de l'apoptose, le cytochrome c libéré de la mitochondrie se fixe sur l'Apaf-1 grâce à ses 13 domaines WD 40 (riches en tryptophane et acide aspartique) (Fig-54). Cette fixation provoque un changement conformationnel de l'Apaf-1, stabilisé par l'ATP. Il se forme une structure complexe en « roue » nommé apoptosome, constitué de 7 molécules d'Apaf-1 reliées par leur domaine

CARD[450]. L'apoptosome est nécessaire au recrutement puis à l'activation de 7 molécules de pro-caspases-9 [451].

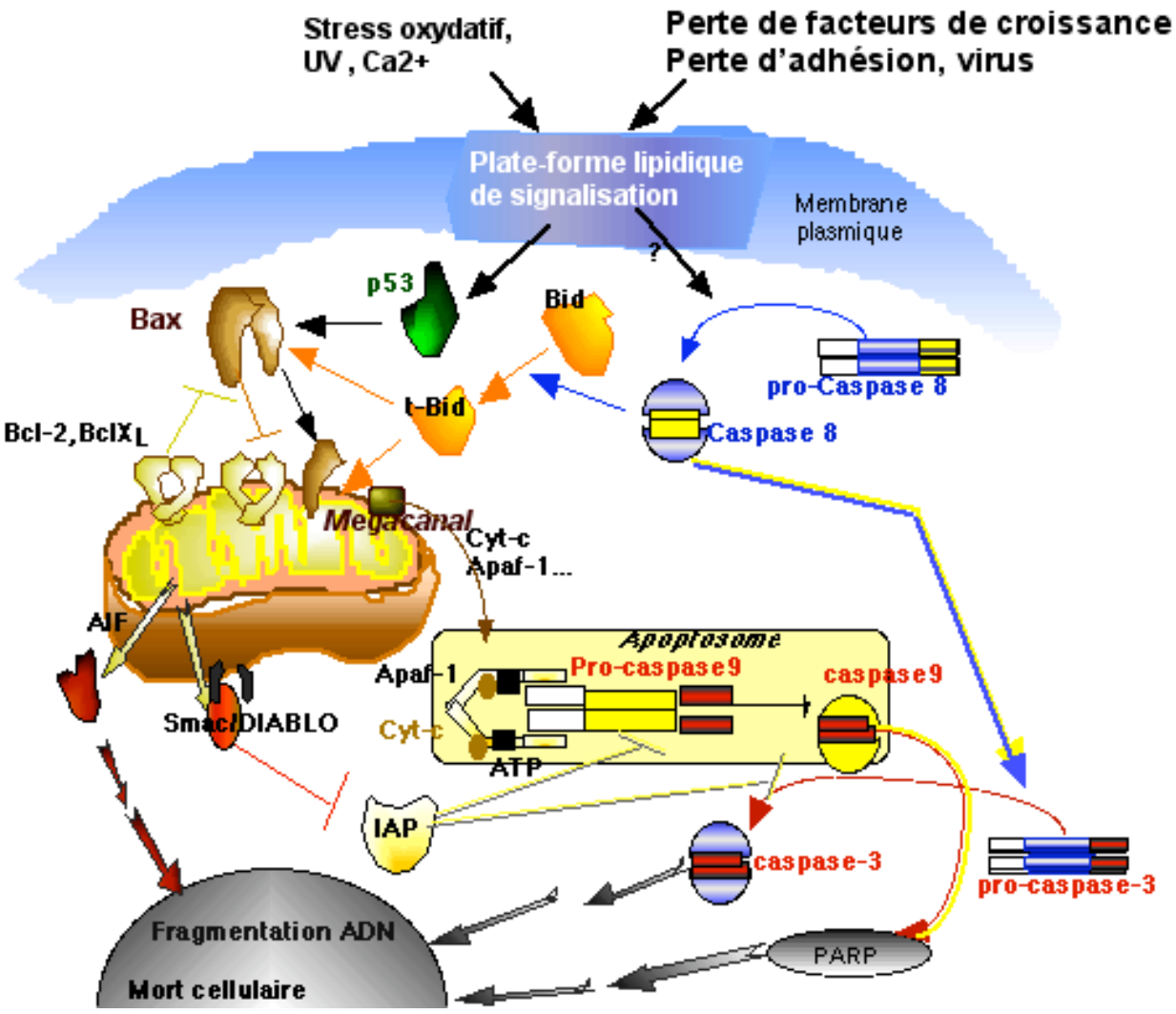


Figure 54 - La voie mitochondriale de l'apoptose d'après MH Ratinaud

b) Les membres de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) sont les principales molécules régulatrices de l'apoptose. On distingue deux groupes de protéines : celles qui ont un rôle anti-apoptotique, comme Bcl-2 et celles qui possèdent une activité, au contraire, pro-apoptotique Bax (**B**cl-2 **A**ssociated **X**) [452].

Tous les membres de la famille Bcl-2 possèdent au moins l'un des 4 motifs : BH1, BH2, BH3, et BH4 (**B**cl-2 **H**omology)[453,454](Fig-55).

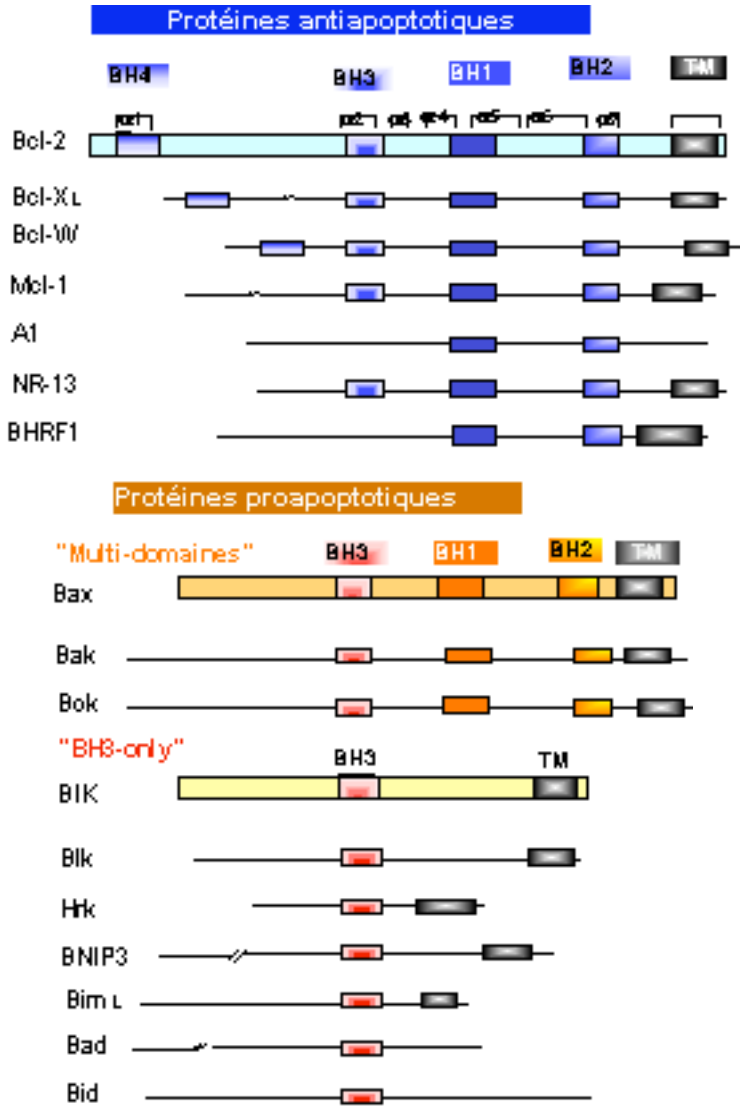


Figure 55 - Principales protéines de la famille Bcl-2 [453,454]

Les membres pro-apoptotiques possèdent les domaines BH1, BH2, et BH3. Un dernier groupe de protéine pro-apoptotiques ne possèdent que le domaine BH3.

La protéine Bcl-2 est constituée de 7 hélices α (dont 2 hydrophobes, α5 et α6). Les domaines BH1 et BH2 sont nécessaires à l'activité anti-apoptotique et à son hétérodimérisation avec les protéines pro-apoptotiques Bax, Bak, Bik et Bid. Les domaines BH1, BH2 et BH3 forment un sillon hydrophobe capable de lier un domaine BH3 d'une autre protéine[453,455]. Le domaine BH4 établit des interactions avec des protéines non apparentées à Bcl-2, la calcineurine. Par ailleurs, Bcl-2 possède une partie C-terminale, hydrophobe permettant son ancrage dans les membranes.

Les molécules de la famille Bcl-2 anti-apoptotiques peuvent se situer dans la mitochondrie, les protéines pro-apoptotiques se localisent le plus souvent dans le cytosol et microtubules.

4. Les voies apoptotiques

Trois phases sont décrites au cours de l'apoptose : une phase d'initiation (réversible), une phase d'exécution et une phase de dégradation.
Il existe deux voies principales d'induction de l'apoptose : la voie mitochondriale et la voie dépendante des récepteurs à domaine de mort. Ces deux voies ne sont pas totalement indépendantes.

a) La voie mitochondriale

La mitochondrie représente l'organite cellulaire clé dans la voie de signalisation indépendante des récepteurs de mort (Fig-54). Elle est capable d'engager ou non de la cellule dans la phase effectrice de l'apoptose. Des facteurs traumatiques (radiations, stress oxydatif, etc…) induisent une perméabilisation de la membrane mitochondriale. Ceci provoque la libération dans le cytoplasme de substances pro-apoptotiques, appelées SIMP (**S**oluble **I**ntermembrane **M**itochondrial **P**roteins) et entraîne la chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_{mt}$).
Les SIMPs sont la procaspase-9, le cytochrome c, la protéine Smac/DIABLO et l'AIF (**A**poptosis **I**nducing **F**actor) [456-458]. Le cytochrome c forme avec l'Apaf-1, l'apoptosome nécessaire à la fois au recrutement et à l'activation de la procaspase-9. Cette procaspase permet la suite de la cascade d'activation des caspases effectrices. La fixation de Smac/DIABLO sur les IAPs (**I**nhibiting **A**poptosis **P**roteins) neutralise leur activité anti-apoptotique. Tandis que, l'AIF est responsable du clivage de l'ADN en fragment de haut poids moléculaire[459].
La régulation de la perméabilité mitochondriale semble un élément déterminant dans le déclenchement de l'apoptose. Toutefois, plusieurs hypothèses ne s'excluant pas, ont été proposées pour expliquer le relargage des effecteurs dans le cytoplasme et leur rôle respectif dans l'exécution de la mort cellulaire (Fig-56).

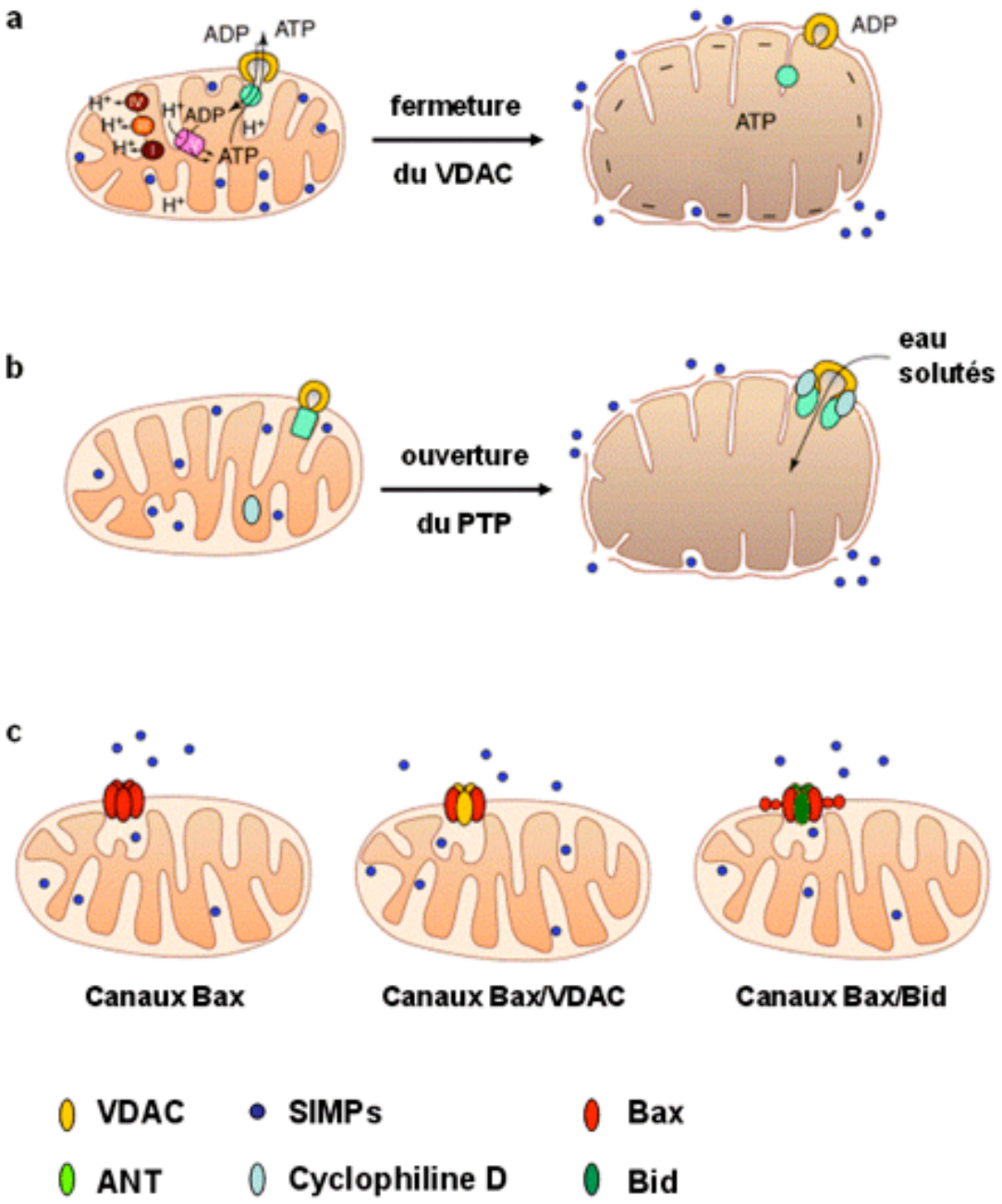


Figure 56 - Relargage des SIMP au cours de la voie intrinsèque de l'apoptose [440,460]

Il pourrait s'agir de :

a) Un dysfonctionnement de l'échange ATP/ADP mitochondrial lié à la fermeture de VDAC entraînant l'accumulation de protons dans l'espace intermembranaire, responsable du gonflement de la matrice et de la production de radicaux oxygénés[461] (Fig-56a).

b) l'ouverture d'un mégapore mitochondrial, appelé PTPC (**P**ermeabiity **T**ransition **P**ore **C**omplex)[462,463]. Ce complexe contient au moins une porine de la membrane

externe permettant le transfert d'anions, le VDAC (**V**oltage **D**épendent **A**nion **C**hannel) et l'ANT (**A**denine **N**ucleotide **T**ranslocase). L'ANT permet l'échange de l'ADP contre l'ATP (Fig-56b).

a) La formation d'un pore dans la membrane externe mitochondriale par les protéines Bax et Bak en s'associant avec VDAC ou des lipides membranaires ou par oligomérisation[464,465](Fig-56c).

D'autres organites cellulaires, en dehors de la mitochondrie, jouent également un rôle dans les phénomènes d'apoptose : le réticulum endoplasmique, le noyau, les lysosomes et l'appareil de Golgi[466].

b) La voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort

L'activation de cette voie fait intervenir des récepteurs de surface ou récepteurs de mort, appartenant à la famille des TNFR (**T**umor **N**ecrosis **F**actor **R**eceptor) sur lesquels se fixent des ligands spécifiques de type cytokine (Fig-56). Parmi ces récepteurs, on note le récepteur Fas (CD95/APO-1), les récepteurs TNF (TNFR-1 (p55/CD120a), TNFR-2) les récepteurs au **T**NF-**R**elated **A**poptosis **I**nducing **L**igand (TRAIL) DR-4 et DR-5, DR3, DR6 et p75NGFR[467]. Ils possèdent dans leur domaine intracellulaire un « domaine de mort » (DD), de 80 acides aminés nécessaire à la transduction du signal de mort[468].

L'induction de l'apoptose, via Fas est la voie de signalisation la mieux connue[469]. L'oligomérisation de Fas permet le recrutement de FADD à la membrane. Ce dernier possède un domaine effecteur de mort dans sa partie N-Terminale pour recruter la procaspase-8 (Fig-57). La multimérisation de Fas après la fixation de son ligand FasL provoque l'association de FADD et de la procaspase-8 pour former DISC (**D**eath-**I**nducing **S**ignaling **C**omplex)[470]. La procaspase-8 est ensuite activée par autoclivage et libérée dans le cytoplasme où elle va cliver les précurseurs des caspases effectrices (caspases-3, -6 et -7).

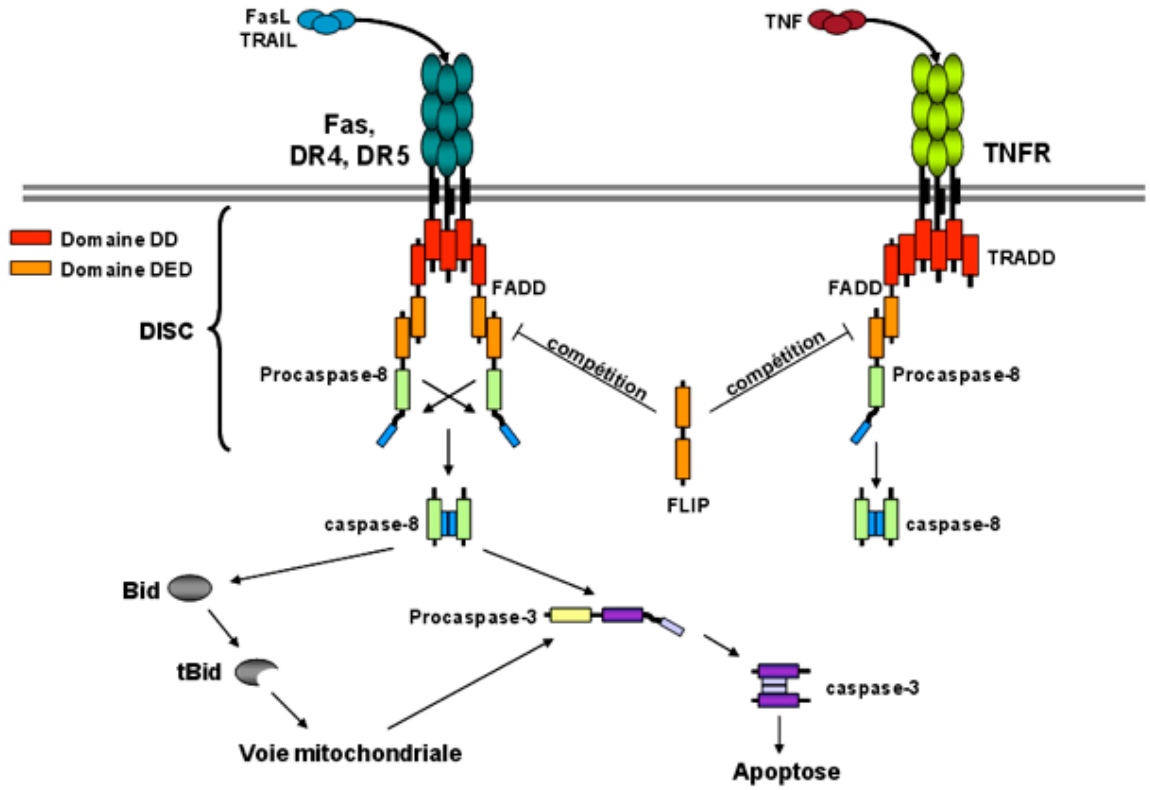


Figure 57- La voie des récepteurs de mort d'après Gupta S [471]

Cette voie de signalisation peut aussi constituer un processus de survie. Cet équilibre entre mort et survie est contrôlé par la formation de complexe [472]. Dans le cas du TNFR1, le complexe I formé de TRADD, TRAF2, cIAP1 et de la kinase RIP1 (qui intervient aussi dans l'autophagie) entraîne l'activation de NF-κB et la survie de la cellule. A l'inverse, la formation du complexe II (formé de TRADD, FADD et la procaspase-8) dans la partie intracytoplasmique active la voie apoptotique[473]. L'équilibre entre ces deux complexes est sous la dépendance de la protéine cFLIP. Sa surexpression provoque l'apoptose en inhibant l'interaction de la procaspase-8 avec le complexe II.

Au vu des données acquises à ce jour, il apparaît que non seulement la voie mitochondriale (indépendante des récepteurs de mort) et celle dépendante des récepteurs de mort sont interdépendantes, mais il existe 2 modalités d'exécution de la signalisation mitochondriale (Fig-58). Une première dépend des caspases d'aval (avec l'ouverture du pore de transition mitochondrial et le relargage du cytochrome c). Tandis que la seconde est indépendante de ces caspases et est liée au relargage de l'AIF. De plus en plus, elle semble s'apparenter à de la nécrose "programmée" et pourrait être liée à une autophagie défectueuse (ou insuffisante) aboutissant à de la mort autophagique.

Figure 58- Schéma synthétique des différentes voies de signalisation

5. Objectif du travail

Le but des travaux était d'évaluer l'efficacité phototoxique des porphyrines de synthèse enrichies en glucides et vectorisée par le motif RGD sur des mélanocytes tumoraux murins et leur affinité pour les cellules endothéliales. La compréhension des mécanismes de mort cellulaire a été abordée.

B-Matériel et Méthodes

1. Les lignées cellulaires

La lignée de mélanocytes tumoraux murins B16F10 (fournie par le Dr Perron (Centre anti-cancéreux de Toulouse, Laboratoire INSERM), Code ATCC (American Type Culture Collection) : CRL-6475) était une lignée tumorale validée sur modèle de souris syngéniques immunotolérantes pour le mélanome, C57bl/6J[474]. Il s'agissait de cellules pigmentées sélectionnées pour leur capacité à métastaser au niveau pulmonaire [Boehm T, Folkman, J 1998].. Les lignées étaient cryopréservées dans du DMSO et maintenues dans l'azote liquide à -192°C.

Les cellules endothéliales capillaires bovines (EJG) (ATCC, CRL-8659) étaient fournies par l'équipe accueil 3839, dirigée par le Pr Franck G. Sturtz, Université de Limoges. Elles dérivent du tissu médullo-surrénale bovin dissocié par une collagènase.

2. La culture cellulaire et les courbes de croissance

a) Culture de cellules endothéliales capillaires bovines

Les cellules EJG adhérentes étaient cultivées dans un milieu de culture « Minimum Essential Medium » (MEM, Invitrogen, BP 96, 95613 Cergy Pontoise Cedex) contenant 25 mM d'HEPES. Le milieu était supplémenté par 2 mM de L-glutamine, des acides aminés non essentiels (1% (Invitrogen), 100 U/ml de pénicilline, 100 µg/ml de streptomycine et 10% de sérum de veau fœtal (BioWhittaker, Walskerville, MD, USA) décomplémenté par chauffage à 56°C pendant 30 min. Elles étaient cultivées en atmosphère humide contenant 5% de CO_2 dans une étuve thermostatée à 37 ° C. Le milieu était changé tous les deux ou trois jours.

A confluence, le milieu était éliminé et le tapis cellulaire lavé par un tampon phosphate stérile (PBS1X : NaCl 1,38 M, KCl 27 mM, Na_2HPO_4 31 mM, KH_2PO_4 14,7 mM, pH 7,4). Les cellules étaient détachées de leur support par incubation de 5 min avec une solution trypsine-EDTA à 0,05% (Invitrogen) pendant 10 min à 37°C. L'action de la trypsine est inhibée par l'addition de milieu de culture complet, les cellules étaient alors centrifugées (10 min, +4°C, 1200 g) puis remises en culture dans du milieu à la densité souhaitée.

b) Culture de lignées mélanocytaires tumorales murines (B16F10)

Après décongélation rapide, les cellules étaient centrifugées afin d'éliminer le surnageant contenant le DMSO. Les cellules étaient adhérentes et étaient ensemencées avec le milieu de DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL, France) contenant 4ml de L-glutamine et 1,5 g/l de bicarbonate de sodium et 4,5 g/l de glucose et 10% de sérum de veau foetal (SVF, bioWhittaker, Walskerville, MD, USA). Les cellules étaient cultivées en atmosphère humide dans une étuve thermostatée à 37°C et 5% de CO_2. Le milieu de culture était changé tous les 3 jours. A confluence, les cellules B16F10 étaient rincées par du PBS, puis décollées par addition d'une solution d'EDTA à 0,03% et de trypsine à 0,25% pendant quelques minutes. Après adjonction de milieu complet (pour inhiber la trypsine), les cellules étaient réensemencées au 1/3 dans différentes flasques de culture[475].

c) Les courbes de croissance des lignées

La croissance des cellules était déterminée sur une durée d'une quinzaine de jours. Pour évaluer la croissance des cellules B16F10, elles étaient ensemencées dans une série de plaques de 96 puits à concentration cellulaire croissante de 100, 250, 500, 1000, 1500, 2000 et 5000 cellules/puits au jour 0. Elles étaient cultivées dans 100µl de milieu DMEM enrichi de 10% de SVF. Pour chaque condition analysée, 12 puits différents étaient réalisés.

Les cellules EJG étaient ensemencées dans des plaques de 24 puits préalablement recouvert de gélatine à 0,1% pour favoriser leur adhérence et une croissance homogène. Les concentrations choisies étaient 500, 1000, 1500, 2000, 5000, 10000 et 20000 cellules/ml au jour 0. Pour chaque condition analysée, 6 puits différents étaient réalisés.

Le milieu de culture était changé tous les 3 jours. Toutes les 24 h pendant 17 jours, la croissance cellulaire était évaluée avec le test MTT par dosage spectrophotométrique.

Les courbes de croissance avaient ainsi permis d'établir la concentration optimale de cellules en phase de croissance exponentielle et non à confluence pour le traitement.

3. Etude de cytotoxicité et phototoxicité

Le test au MTT, test de viabilité cellulaire était utilisé afin d'évaluer indirectement la prolifération cellulaire. Il est basée sur la transformation du MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) (MTT, Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France) en

cristaux bleus de formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase [476]. Les cristaux formés sont solubilisés et sont détectables par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 570 nm. La dissolution des cristaux dans l'isopropanol acide produit une coloration proportionnelle à l'activité mitochondriale dans les limites de la loi de Lambert-Beer.

Après un temps de culture variable de 1 à 17 jours, 50 µl de MTT (0,5 mg/ml dans du tampon PBS) étaient déposés dans chaque puits. La réduction du sel de tétrazolium était révélée 1 heure plus tard en retirant le mélange de milieu et MTT et en ajoutant 100 µl de DMSO (Sigma). L'homogénéité de la coloration était obtenue par agitation des plaques à 37°C pendant 15 min et à l'abri de la lumière. Les densités optiques de chaque puits étaient évaluées à 540 nm avec un lecteur de plaque ELISA (Multiskan EX, version 1.1, Labsystems).

Les « blancs » de lecture correspondaient à du DMSO contenant du MTT. Les résultats étaient présentés sous forme de courbes retraçant l'évolution de l'absorbance en fonction du temps. La viabilité et le nombre de cellules avaient également été estimés par le test d'exclusion au bleu Trypan (Sigma) après numération de cellules sur lame de Malassez. Le nombre de cellules mortes (colorées en bleu) par ml de milieu était alors déterminé par comptage au microscope optique en contraste de phase (NIKON TMS) sur une cellule de Malassez.

4. Les porphyrines de synthèse RGD

a) Solubilisation des porphyrines-RGD

Les mono-RGD-triglucosylporphyrines avaient été synthétisées par le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN). Ce sont des porphyrines sur lesquelles avait été greffée la séquence peptidique RGD (Arginine-glycine-aspartique) en ortho ou en para. La porphyrine, triglucosylporphyrine-RGD ortho (TG-RGDo) avait été solubilisée dans du milieu de culture DMEM sans SVF afin d'obtenir une solution mère à 10^{-3} M conservée à -80°C. Des dilutions multiples avaient permis d'obtenir des solutions-filles de concentration variant de 10^{-5} à 10^{-8}M. La porphyrine triglucosylporphyrine-RGD para (TG-RGDp) avait été solubilisée avec du milieu DMEM sans SVF pour obtenir une solution-mère à 10^{-2}M.

b) Incubation des porphyrines

Les cellules EJG étaient ensemencées à concentration adaptée avec les courbes de croissance dans des plaques de 24 puits recouverts avec de la gélatine à 0,1%, afin d'évaluer les effets biologiques de la porphyrine de synthèse. A J3 de l'ensemencement, le milieu de culture était remplacé par des concentrations variables de porphyrine solubilisée dans du milieu de culture. Deux plaques de cellules étaient ensemencées afin de vérifier la croissance cellulaire avant traitement à J-1 et J-2. Plusieurs témoins avaient été utilisés. Des cellules sans PS et des cellules avec des concentrations différentes de PS étaient illuminées permettant de déterminer la concentration photocytotoxique. Des cellules sans PS et des cellules avec PS à concentrations variables étaient maintenues à l'obscurité permettant de définir la concentration non cytotoxique. Les plaques étaient alors protégées de la lumière par du papier aluminium afin d'éviter la photodégradation de la porphyrine.

Les cellules B16F10 étaient ensemencées à concentrations adaptées dans des plaques de 96 puits noires avec un couvercle recouvert de papier aluminium.

Toutes les manipulations impliquant la porphyrine avaient été réalisées en fin de nuit, sous hotte éteinte en semi-pénombre pour ne pas dégrader la porphyrine.

5. Les sources lumineuses

Deux sources lumineuses avaient été utilisées pour réaliser l'évaluation de la phototoxicité des porphyrines de synthèse. Il s'agissait d'une source de lumière rouge et d'une source de lumière bleue.

a) La lampe Waldmann PDT 450L

La Photothérapie dynamique PDT 450 L est une source lumineuse avec une forte intensité d'émission et une irradiation homogène grâce à la présence de réflecteurs (Fig-59). L'unité est équipée de 3 modules orientables selon 2 axes avec 12 tubes fluorescents F-36/Blue V type, de 36W. Le système possède un ventilateur silencieux. Le pic du spectre d'émission se situe à 420 nm (380-470 nm) ce qui correspond au spectre d'absorption du PS (AAL) (Fig-60). La dose maximale d'irradiation est de 20 J/cm^2.Le temps d'irradiation en seconde correspond à la dose en J/cm^2 x 1000 et divisée par l'intensité de la lampe en mW/cm^2.

Figure 59 - Photothérapie Dynamique PDT 450L

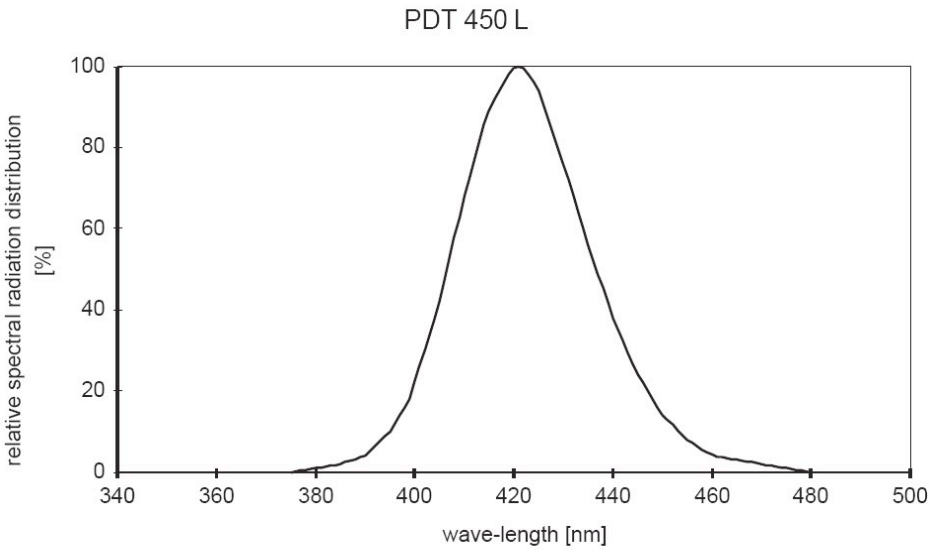


Figure 60 - Spectre d'émission de la lampe Waldmann™ PDT 450L

La distance entre la source lumineuse et les plaques de puits contenant les cellules était de 37 cm.

b) La Lampe PhotoDyn 501 Cosmedico

L'appareil de PTD Cosmedico permet une illumination en lumière rouge intense avec un filtre éliminant les infra-rouges (IR) nocifs pour la peau (Fig-61). La distance entre la source lumineuse et la cible est constante à 25 cm avec un champ lumineux homogène de 10 cm de diamètre. L'utilisation d'un filtre orange permet l'émission d'une lumière rouge d'un spectre allant de 600 nm à 1400 nm avec un maximum de 800 nm.

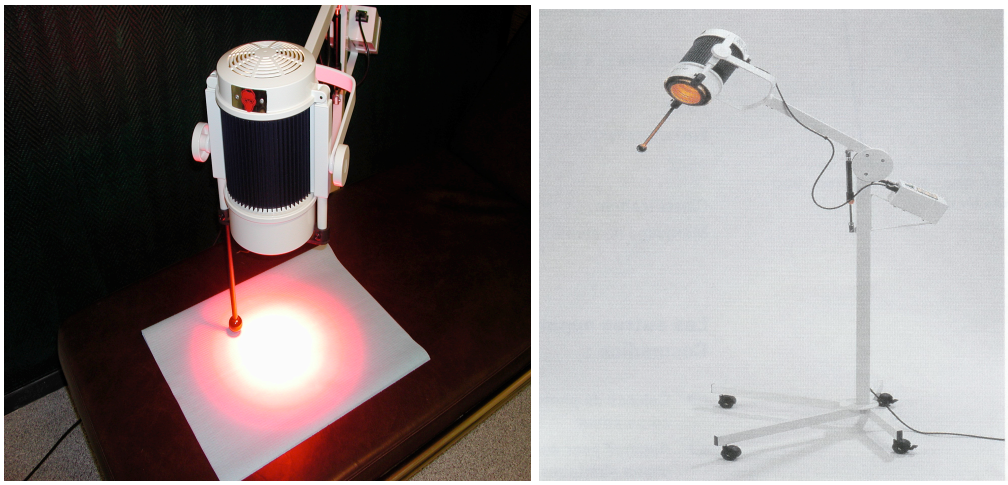


Figure 61 - La lampe PhotoDyn 501, Cosmedico

6. Protocole de photothérapie dynamique en lumière bleue et en lumière rouge

Les cellules ensemencées en plaque noire de 96 puits depuis 48h étaient illuminées 3 heures après incubation avec la porphyrine testée. Une seule illumination des lignées à J3 de l'ensemencement était réalisée avec la lampe Waldmann™, en lumière bleue à 10 J/cm^2 (Fig-62). Le temps d'irradiation était de 12 min 03 secondes.

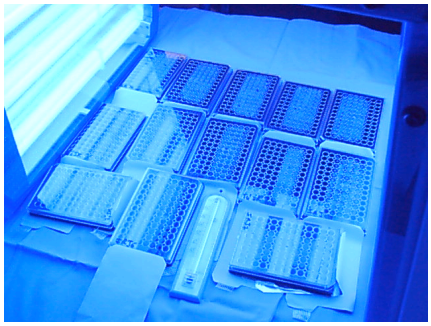


Figure 62 - Séance d'illumination en lumière bleue des plaques de 96 puits contenant des B16F10

Les cellules étaient illuminées 3 heures après incubation avec la porphyrine testée. Une seule illumination des lignées à J3 de l'ensemencement était réalisée avec la lampe Cosmedico™, en lumière rouge à 50 J/cm^2 (Fig-63). Le temps d'irradiation était de 11 min 06 secondes.
La mesure de la température ambiante était mesurée avant le début de l'illumination et après par un thermomètre à mercure. Un test de prolifération au MTT était réalisé immédiatement après illumination, puis 24h, 48h et 72 heures après l'illumination.

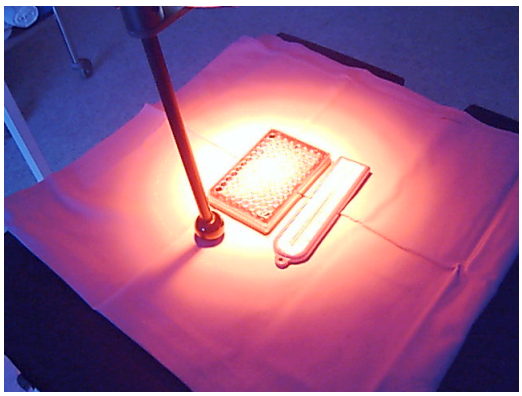


Figure 63 - Séance d'illumination en lumière bleue des plaques de 96 puits contenant des B16F10

7. Etude comparative avec le photosensibilisant de référence : le Photofrin®

Les porphyrines de synthèse étaient comparées au PS de référence le Photofrin®. Il s'agissait d'un mélange et la masse molaire variait de 1178 à 4659 Da. Une solution-mère de Photofrin® était réalisée à la concentration de 10^{-3}M, et cryoconservée à -80°C. Le Photofrin® dilué au $10^{ème}$ était incubé deux heures avant l'illumination en lumière rouge par la lampe PhotoDyn™ Cosmedico.

8. Etude de la localisation de la porphyrine de synthèse en microscopie de fluorescence conventionnelle et confocale

Afin d'optimiser l'efficacité de la TG-RGD, nous voulions localiser la porphyrine et comprendre les mécanismes d'action cellulaire. Afin de déterminer le meilleur temps d'incubation avant de réaliser l'illumination et de visualiser le compartiment cellulaire où elle s'accumulait, nous avions utilisé l'autofluorescence, la propriété naturelle de la porphyrine.
Son excitation maximum se situe à 420 nm et elle émet une fluorecence rouge (600 à 800 nm).
La microscopie confocale est basée sur la microscopie à fluorescence avec une source lumineuse laser. Le faisceau laser excitant pénètre dans l'échantillon cellulaire. Il y a alors une émission de fluorecence après excitation de la porphyrine à sa longueur d'excitation appropriée. Grâce à un diaphragme variable éliminant le signal fluorescent des autres plans, il est possible de sélectionner un seul plan de la préparation. Ces rayons passent à travers un bloc de filtrage des longueurs d'onde, puis arrivent à un système de détection par photomultiplicateurs.
Les mélanocytes tumoraux murins et les cellules EJG étaient observés en microscopie confocale à des temps différents par rapport à l'adjonction de la porphyrine à concentration efficace : 15 min, 30 min, 1h, 1h30, 2h, 2h30, 3h, 3h30, 4h, 5h, 6h, 10h, 12h, 14h et 24h.
Les cellules B16F10 et EJG étaient ensemencées à la concentration de 6000 cellules/puits dans des plaques de 24 puits dans lesquels étaient préalablement déposés des lamelles de verre.
Le TG-RGDo à 10^{-5} M était déposé dans chaque puits, sauf un puits pour le témoin. Aux différents temps sus-cités, le milieu contenant le PS était retiré, puis les cellules étaient rincées une fois avec du PBS.

Elles étaient ensuite fixées par une solution de paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 20 min à température puis rincées au PBS1X. Les lamelles étaient ensuite fixées sur les lames avec l'Immumount (Shandon-Immumount, Pittsburgh).

10. Etude de la fragmentation de l'ADN par la méthode du DAPI

Le DAPI (Di Aminido Phényl Indo) interagit avec les bases AT de l'ADN. Après excitation dans le proche UV (372 nm), il émet une fluorecence bleue à 450 nm (Fig-64). Il est utilisé à la fois pour quantifier l'ADN mais aussi pour suivre des modifications de la condensation de la chromatine.

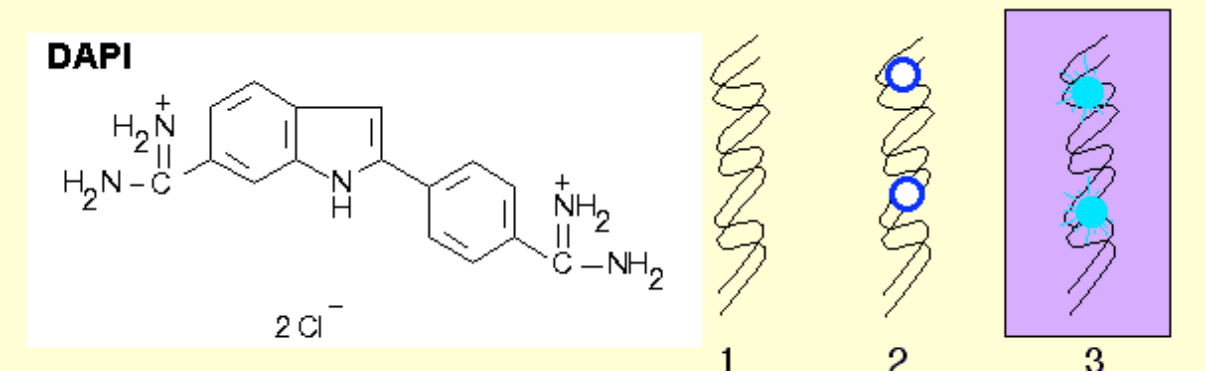


Figure 64 - Structure du DAPI et Principe du marquage de l'ADN

Les cellules étudiées étaient cultivées sur lamelles circulaires de verre dans des plaques de 24 puits et ensemencées à une densité de 6000 cellules/puits. Le milieu de culture était retiré et les cellules étaient rincées deux fois au PBS1X, avant fixation avec le PFA à 4% pendant 20 minutes à température ambiante. Elles étaient ensuite rincées 2 fois au PBS1X. Les lamelles étaient incubées avec 500 µl de DAPI pendant 5 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Un rinçage des lamelles au PBS était effectué avant de les fixer avec une goutte de montage Immumount. Après une nuit de séchage à 4°C, les lames était observées au microscope à fluorescence avec un filtre UV (excitation 358 nm, émission 461 nm).

11. Etude des phénomènes de nécrose par la détection de production de LDH

Le lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytoplasmique présente dans toutes les cellules. Elle est libérée dans le surnageant de culture de cellules lorsqu'il y a un dommage de la membrane plasmique. L'activité de la LDH libérée par les cellules endommagées est

évaluée en mettant en contact un substrat coloré (Kit, Roche Applied Science) qui est transformé en sel de formazan coloré dont on mesure le densité optique.

Après traitement photodynamique des cellules, les cellules et le surnageant étaient récupérées immédiatement puis incubés avec le substrat INT (sel de tétrazolium). Puis la coloration développée était lue avec un lecteur de plaque ELISA à 540 nm (Multiskan EX, version 1.1, Labsystems).

C-Résultats

1. Détermination de la concentration optimale de cellules à ensemencer par puits.

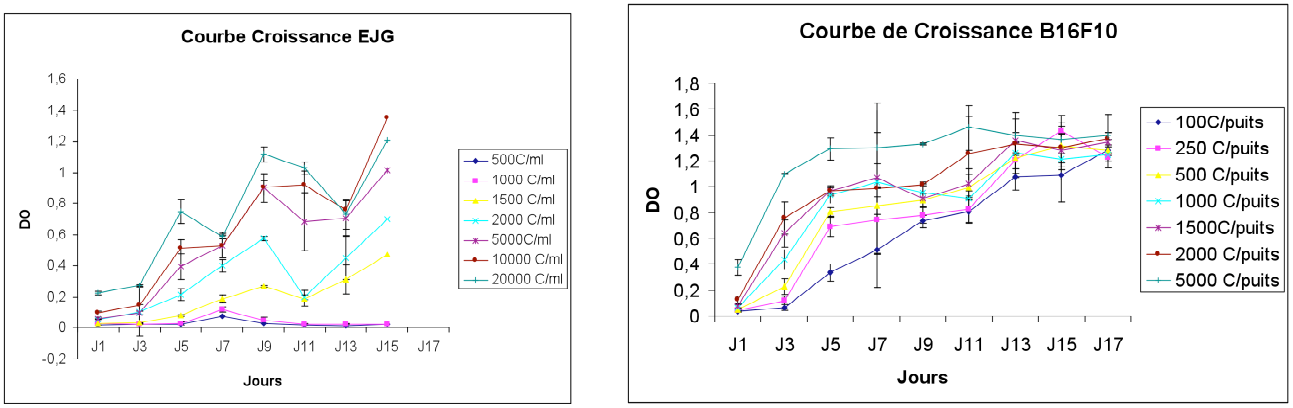


Figure 65 - Courbe de croissance des lignées EJG et B16F10

La concentration optimale de cellules B16F10 était de 500 cellules/puits et permettait d'obtenir à J3 des cellules en phase exponentielle de croissance qui n'atteindraient pas la confluence à J2 du traitement photodynamique (Fig-65). La concentration d'EJG est de 2000 cellules/puits.

2. Evaluation de l'efficacité in vitro des porphyrines à motifs RGD en lumière rouge sur des mélanocytes tumoraux murins et des cellules endothéliales

La première étape était de vérifier que les TG-RGD n'étaient pas cytotoxiques pour les cellules en l'absence de lumière. Le comptage et la viabilité en présence de porphyrine étaient effectués par un test d'exclusion au Bleu Trypan. Les résultats étaient comparés avec des cellules témoins non exposées au PS. Des tests de MTT permettaient de confirmer les résultats en montrant des courbes superposables.

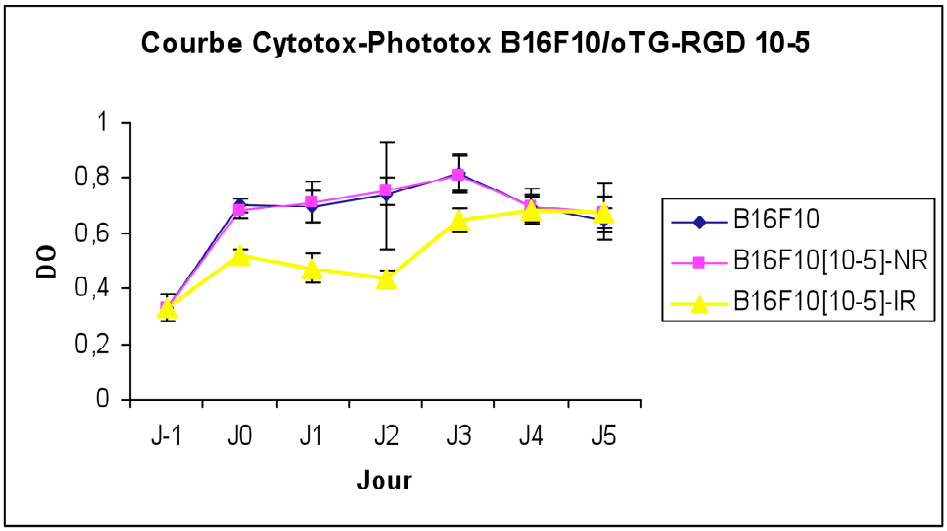
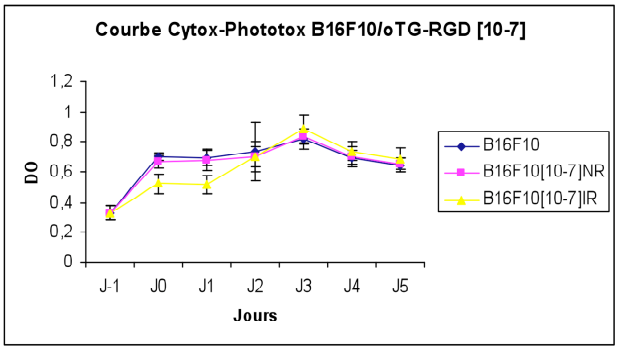
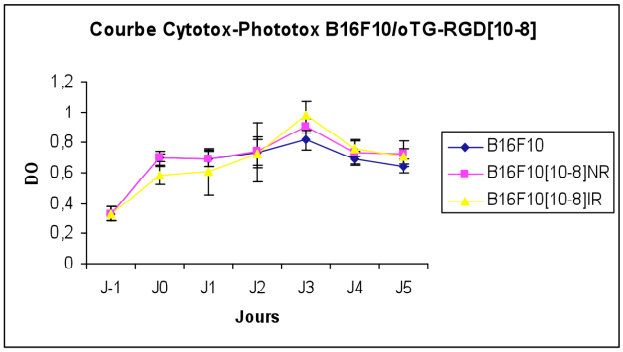


Figure 66 - Etude de la cytotoxicité et phototoxicité de la triglucosylporphyrine-RGDo sur les B16F10

La TG-RGDo était photoxique à 10^{-5}M sur les cellules B16F10 et non cytotoxique à l'obscurité (Fig-66). Aucun effet photodynamique significatif n'était observé avec les concentrations 10^{-6}, 10^{-7} et 10^{-8}M (Fig-67).





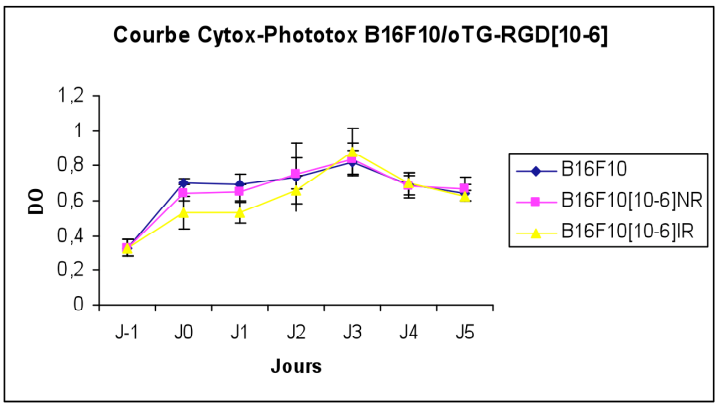


Figure 67 - Courbes de cytotoxicité et phototoxicité à des concentrations variable de la porphyrine sur les B16F10.

La TG-RGDp était phototoxique à la concentration de 10^{-4} M (150 µg/ml) sur les mélanocytes tumoraux murins et non cytotoxique lorsque les cellules étaient maintenues à l'obscurité (Fig-68). A l'inverse aucun effet photodynamique n'était observé avec des concentrations inférieures (Fig-69).

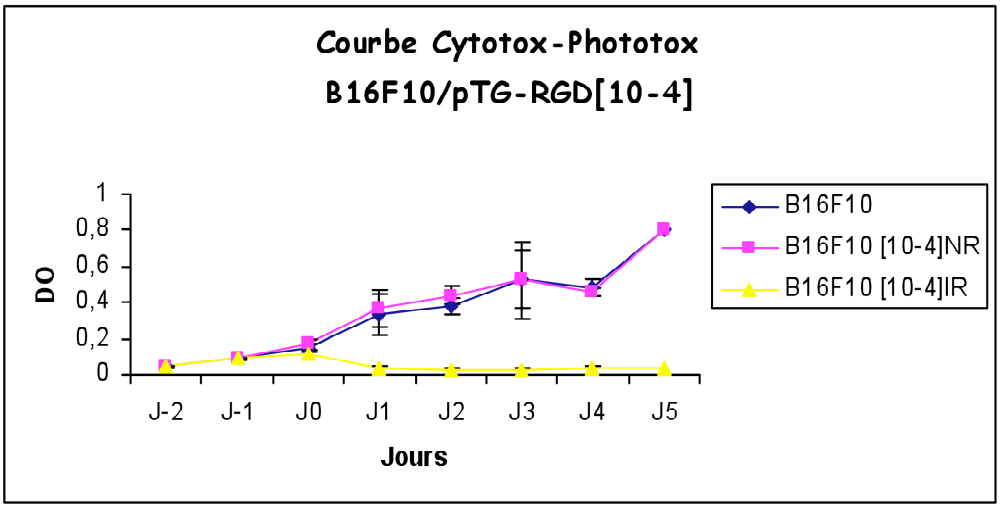
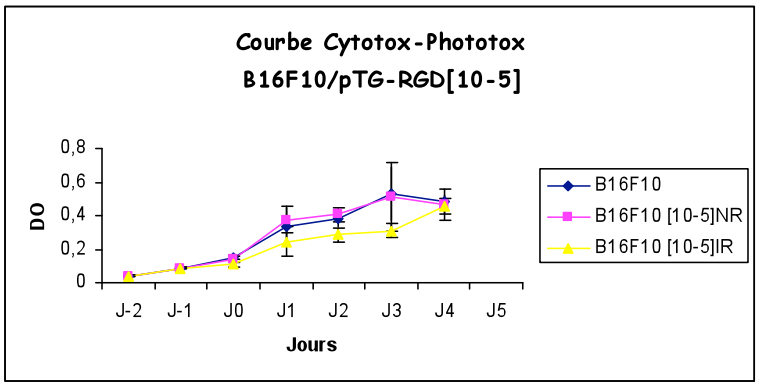
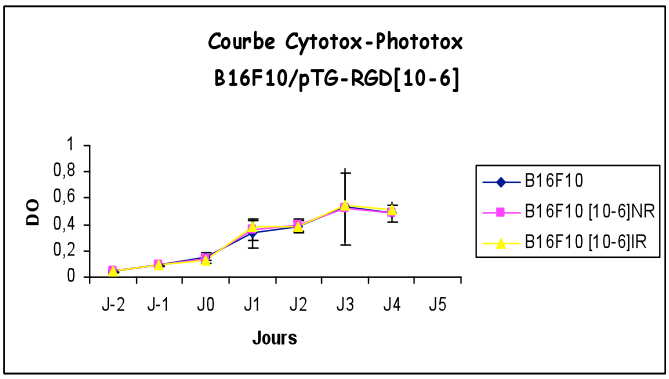


Figure 68 - Etude de la cytotoxicité et phototoxicité de la TG-RGDp sur les B16F10





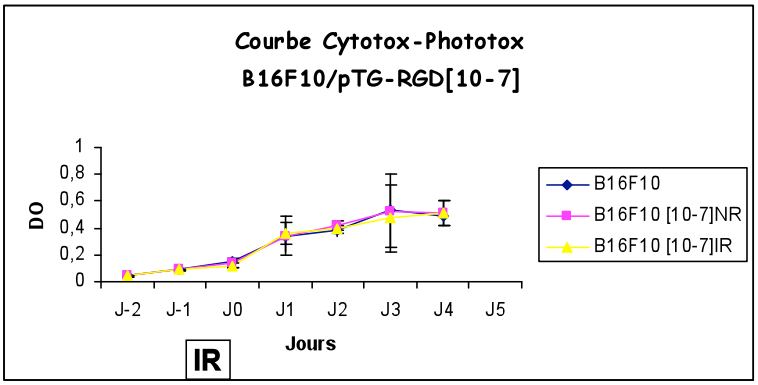
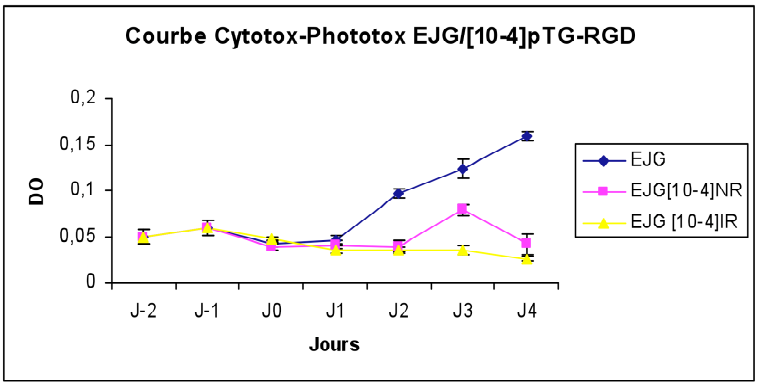
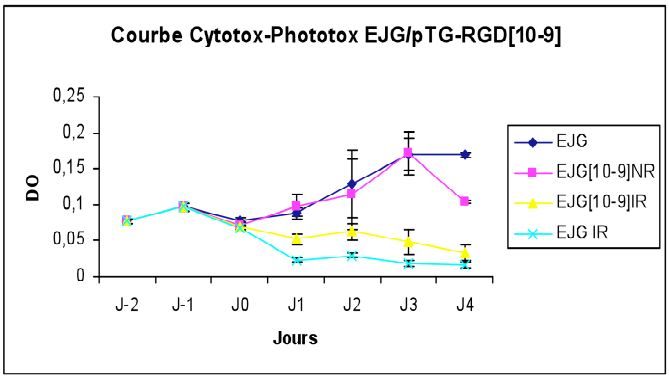


Figure 69 - Courbes de cyto et phototoxicité de concentration variable de TG-RGDp sur les B16F10

La porphyrine TG-RGDp était cytotoxique à la concentration de 10^{-4}M sur les cellules endothéliales EJG (Fig-70). L'effet photodynamique était noté pour une concentration de 10^{-9} M.

Figure 70- Etude de la cytotoxicité et de la phototoxicité de la TG-RGDp sur les EJG





La TG-RGDo avait montré une photocytotoxicité comparable que la TG-RGDp sur les cellules EJG et sur les B16F10 aux mêmes concentrations.

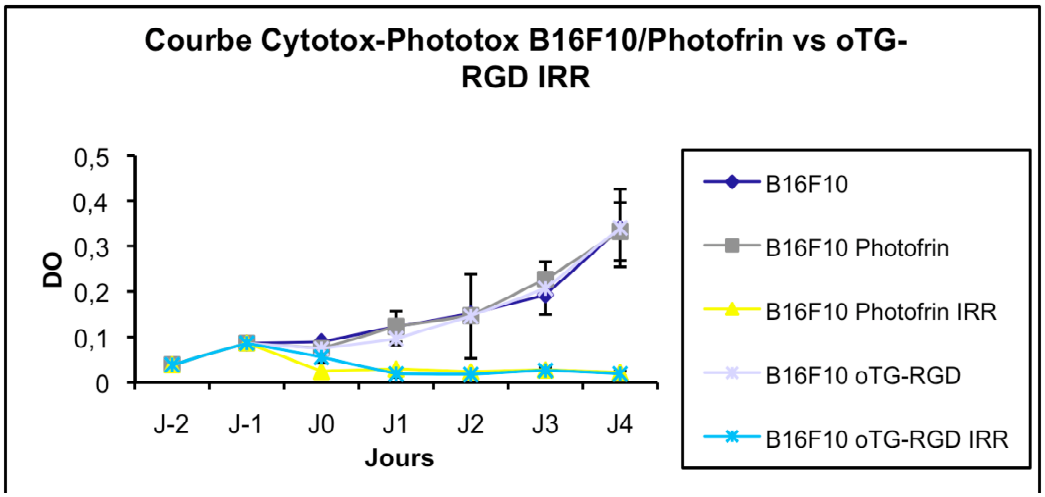
L'isoforme ne semblait pas joué un rôle dans les effets photodynamiques ou cytotoxiques.

3. Comparaison de l'efficacité des porphyrines à motifs RGD avec le Photofrin® en lumière rouge

La TG-RGDp ou TG-RGDo apparaissait aussi efficace que le Photofrin® (15 µg/ml) à concentration équivalente sur des mélanocytes tumoraux murins B16F10 (Fig-71).

L'effet photodynamique était significativement comparable au PS de référence.

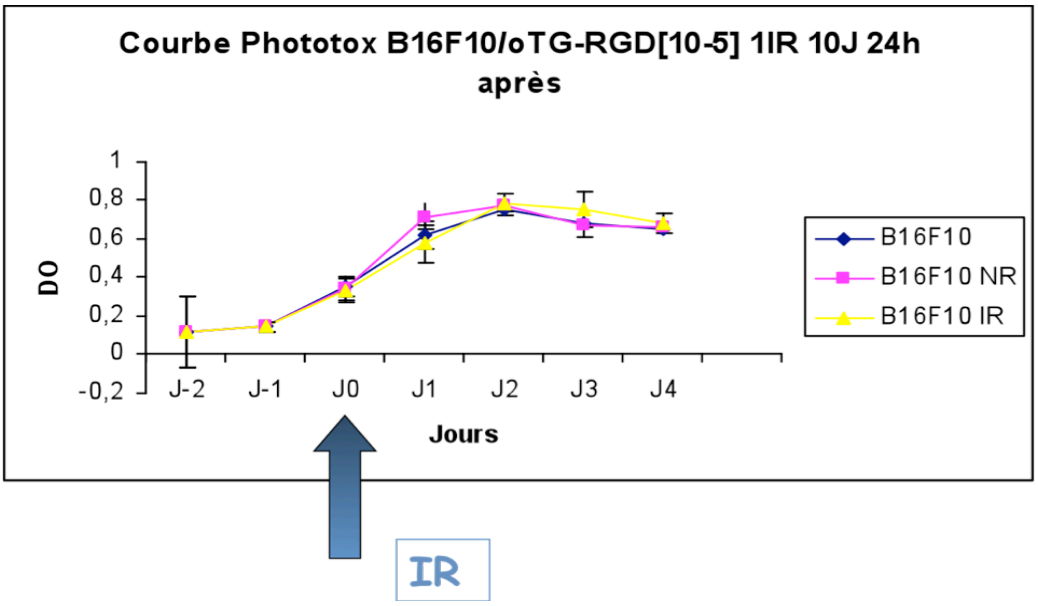
Figure 71 - Etude comparative de l'efficacité du Photofrin® et de la TG-RGDo sur les B16F10



4. Détermination de la clairance d'élimination de la porphyrine de synthèse à motifs RGD

Lorsque l'illumination était effectuée après 24h d'incubation de la porphyrine de synthèse RGD, quelle que soit l'isoforme para ou ortho, on n'observait plus d'effet photocytotoxique (Fig-72). Cela pourrait signifier que la TG-RGD a été métabolisée ou dégradée au niveau cellulaire, laissant présager une clairance d'élimination rapide de la porphyrine.

Figure 72 - Inefficacité de l'illumination après 24hd'incubation.

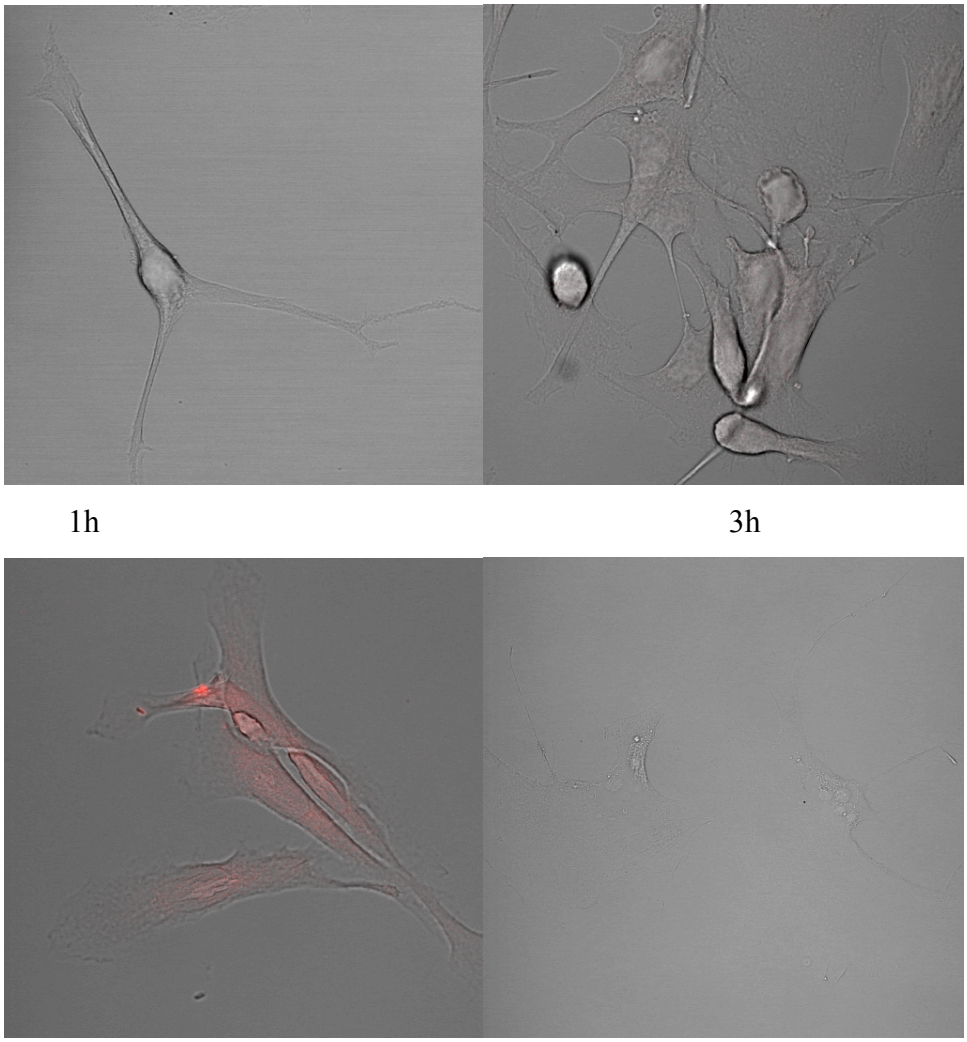


5. Etude de la localisation de la porphyrine en microscopie confocale et en microscopie à fluorescence

En microscopie confocale, une fluorescence rouge très modérée était observée à 3h alors qu'aucune n'est visible à 1h (Fig-73).

La fluorescence envahissait le cytoplasme à 12h et avait complètement disparu à 24h.

Figure 73- Image de microscopie confocale, visualisation de l'autofluorescence de la porphyrine



1h 3h

12h 24h

L'intensité de la fluorescence était faible et la densité cellulaire était faible malgré un ensemencement à 6000 cellules/puits.

Lorsque les cellules B16F10 étaient observées au microscope à fluorescence, une fluorescence était détectée à 3h mais pas à 1 heure ni avec les lames témoins qui n'avaient pas été en contact avec le PS (Fig-74).

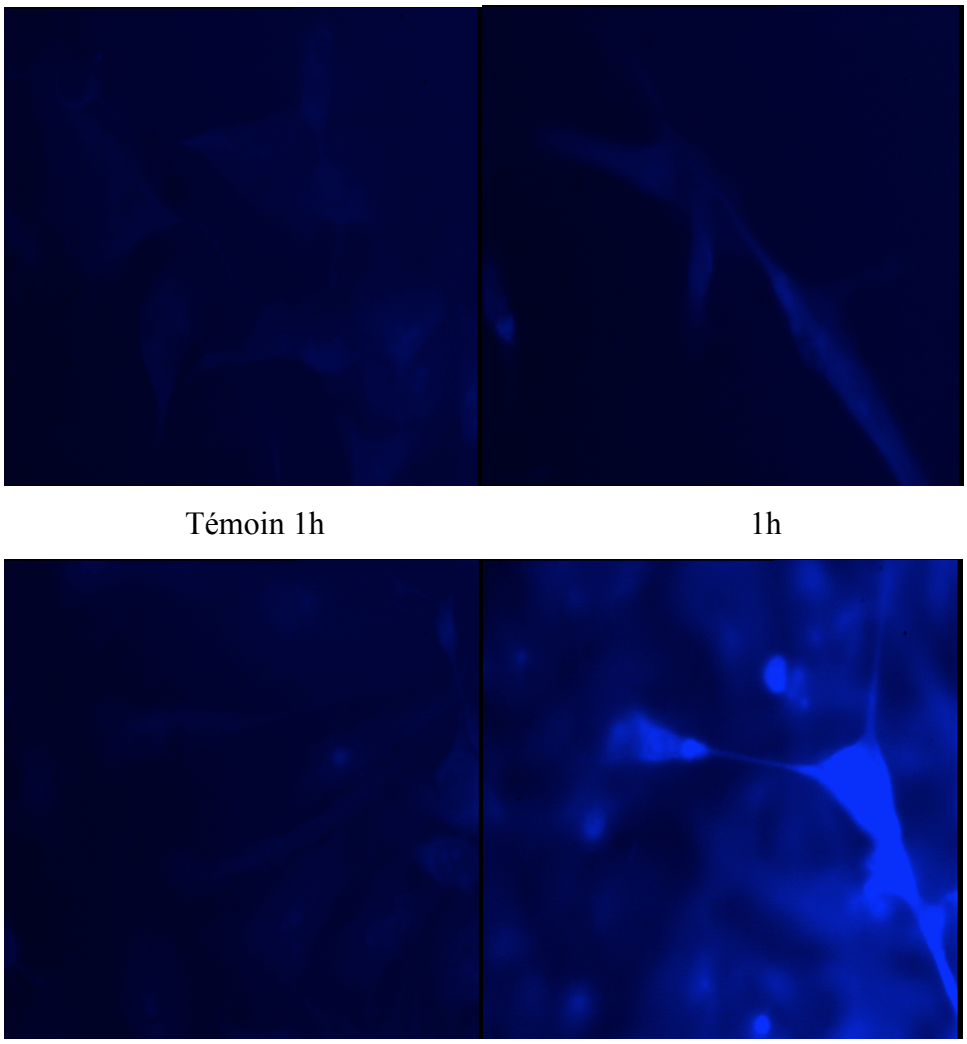
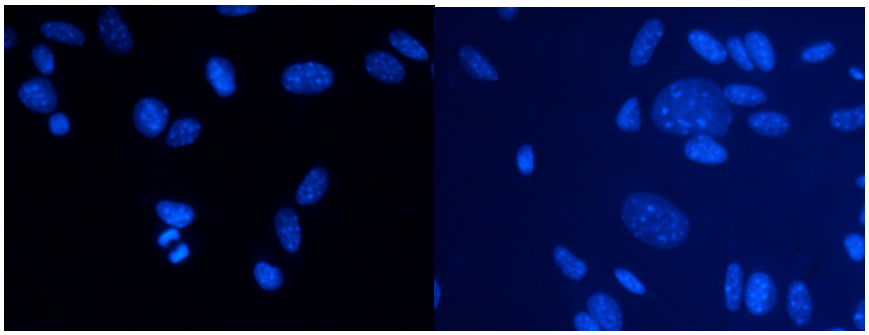


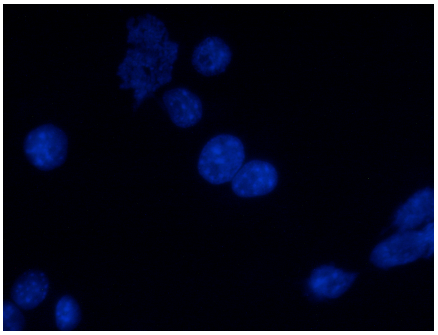
Figure 74 - Image de microscopie à fluorescence : visualisation de la fluorescence diffuse et cytoplasmique à 3h d'incubation de la porphyrine de synthèse

6. Etude de la fragmentation de l'ADN après PTD

La perte de cellules observée 24h après le traitement laissait supposer une mort cellulaire par apoptose. Le DAPI ne montrait pas de fragmentation du noyaux 12h après et 24h après les séances par rapport aux cellules témoins non traitées (Fig-75).



Cellules témoins non irradiées à 24h Cellules Irradiées à 24h



Cellules irradiées à 12h

Figure 75 - Image de DAPI

7. Etude de la photocytotoxicité par détection de la production de LDH

Aucune production de LDH n'a pu être mis en évidence par le Kit de nécrose après traitement des cellules par la porphyrine de synthèse.

8. Evaluation de l'efficacité in vitro des porphyrines à motifs RGD en lumière bleue sur des mélanocytes tumoraux murins et des cellules endothéliales

L'illumination des plaques de cellules préalablement incubées avec les TG-RGD en lumière bleue avec la lampe Waldmann PDT 450L montrait une efficacité de la lumière bleue seule. La photocytoxicité de la lumière bleue seule semblait supérieure à la photocytotoxicité induite par l'adjonction de la porphyrine de synthèse TG-RGD.
Les premières illuminations étaient réalisées avec une lumière rouge et aucune phototoxicité de la lumière rouge n'était observée.
En effet, la lumière rouge ne paraît pas phototoxique sur les mélanocytes tumoraux murins et les cellules endothéliales capillaires bovines (Fig-76, 77, 78, 79)

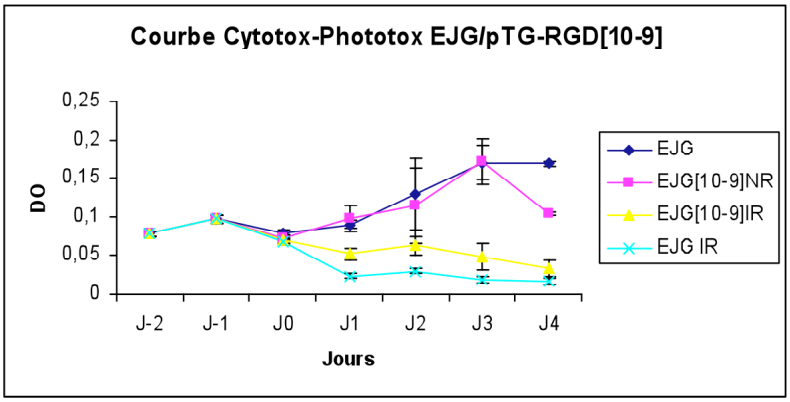


Figure 76- Etude de la cytotoxicité et photocytoxicité de la TG-RGDp sur les EJG et l'action de la lumière bleue

Figure 77- Etude de la phototoxicité de la lumière bleue sur les cellules mélanocytaires tumorales murines B16F10

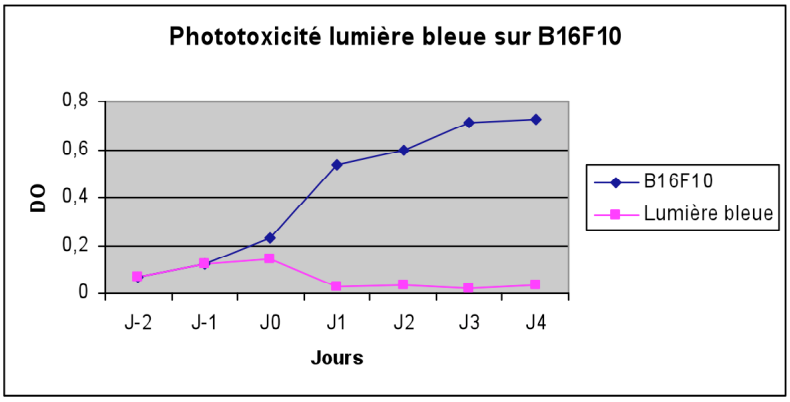


Figure 78- Phototoxicité de la lumière bleue et rouge sur les B16F10

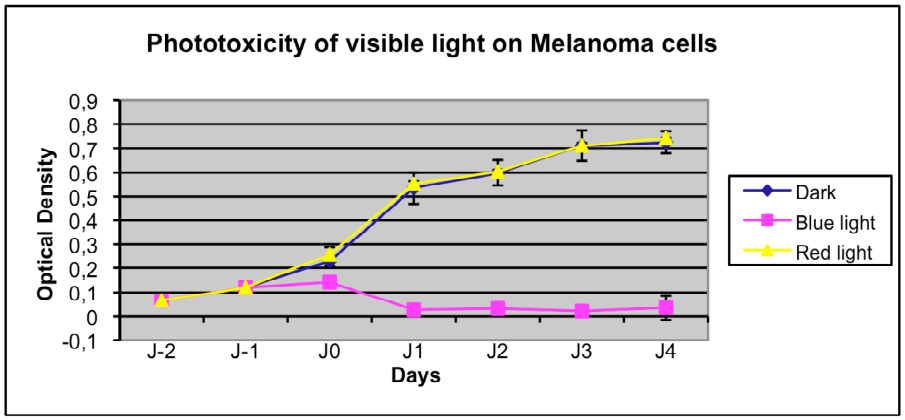
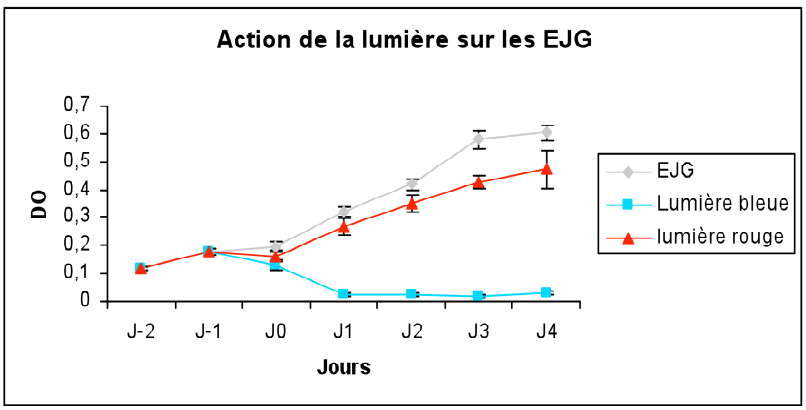


Figure 79- Phototoxicité de la lumière rouge et bleue sur les cellules EJG



D-Discussion

Ce travail a permis de démontrer les effets photodynamiques des triglucosylporphyrines-RGD sur deux populations cellulaires impliquées dans la tumorogénèse *in vitro* après une illumination en lumière rouge.

La néovascularisation des tumeurs malignes représente une cible intéressante en thérapeutique. La vectorisation d'une porphyrine enrichie en résidu glucidique paraissait être une molécule capable d'être active sur les mélanocytes tumoraux murins et des cellules endothéliales. C'est pourquoi des mélanocytes tumoraux murins B16F10, connus pour leur pouvoir métastatique, et des cellules endothéliales capillaires bovines ont été utilisés dans ce travail. Les B16F10 sont également capables d'exprimer à leur surface l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ permettant la fixation du motif RGD.

La porphyrine de synthèse évaluée sur les B16F10 était photocytotoxique quelle que soit sa conformation en *ortho* ou en *para* à des concentrations différentes. La PDT avec une porphyrine de synthèse vectorisée sur une intégrine de surface des mélanocytes tumoraux murins est efficace sur des cellules pigmentées mélaniques.

Cette étude permet d'établir un effet photocytotoxique de la TG-RGD sur des cellules endothéliales et permet d'envisager un développement ciblé de cette porphyrine pour le traitement des néovascularisations ou de tumeurs vasculaires. La PTD agit au moins sur 3 voies : une mort cellulaire directe par nécrose ou apoptose[477], des dommages vasculaire aboutissant à une hypoxie tumorale sévère[478], et enfin une réponse inflammatoire et immunologique contre la tumeur[57].

Les trois mécanismes se combinent probablement pour obtenir la destruction tumorale[12]. La porphyrine de synthèse testée n'a pas montré de supériorité en terme d'efficacité par rapport au Photofrin® sur les cellules endothéliales EJG. Elle montrait à l'inverse une sensibilité plus importante que les B16F10 puisque pour obtenir une efficacité similaire avec les cellules mélanocytaire malignes des concentrations supérieures de TG-RGD. Triesscheijn *et al* ne montraient pas de différence de sensibilité entre les cellules endothéliales et des cellules non mélaniques[155]. Il est donc probable que les mélanocytes soient plus résistants à la PTD et justifient de conditions différentes en terme de doses de PS et d'illumination.

Le temps optimal d'incubation permettant la fixation et la pénétration de la porphyrine de synthèse RGD testé et son efficacité maximale a été établie à 3h. Le protocole d'irradiation en lumière rouge consistait en une illumination de 50 J/cm^2 avec un spectre de 600 à 1400 nm et

un maximum de 800 nm. Ce type de lumière permet d'augmenter la pénétration tissulaire du faisceau lumineux et donc l'efficacité de la porphyrine sans rentrer en compétition avec la longueur d'onde d'absorption à 630 nm de la mélanine[327]. Il est rapporté que la pigmentation des tumeurs pourrait être à l'origine d'une faible efficacité de la PTD[329]. Nos résultats suggèrent que la mélanine ne semble pas être un obstacle probablement parce que la longueur d'onde d'excitation utilisée était proche de 800 nm. Michailov *et al* démontraient que l'utilisation de longueur d'onde proche de 800 nm et d'une intensité lumineuse élevée étaient efficaces sur les B16F10[336].

Certains auteurs ont émis l'hypothèse du rôle thermique de PTD avec la lumière rouge pour expliquer son efficacité. La mélanine serait capable de transformer la lumière absorbée en énergie thermique[328]. L'intensité de l'illumination (entre 100 et 300 mW/cm^2) pourrait jouer un rôle dans la génération de cet effet thermique[479,480]. Mais cet effet est probablement insuffisant pour expliquer à lui seul la destruction des cellules tumorales.

Par ailleurs la mélanine, lors des séances de PTD pourrait absorber les radicaux libres produits et expliquerait la moindre efficacité de PTD sur les cellules pigmentées [481].

Plusieurs applications cliniques de la PTD ont utilisées la lumière visible rouge (625-640 nm) pour le traitement de tumeurs car cette longueur d'onde permettait une meilleure pénétration tissulaire et donc une meilleure efficacité de la PTD en cancérologie[94,247]. Le développement de la lumière bleue en dermatologie trouvait une justification dans le fait que les pathologies tumorales étaient plus volontiers superficielles. Bandieramonte *et al* ne montraient aucune différence significative d'efficacité sur des CBC et des métastases cutanées de cancer mammaires en PDT entre une illumination en lumière verte versus en lumière rouge[247]. Mais les ulcérations et les délais de cicatrisation post-PTD étaient plus longs lors des illuminations en lumière rouge.

Au cours de l'étude, on notait une clairance d'élimination de la porphyrine de moins de 24h puisque les cellules incubées avec la porphyrine de synthèse et illuminées en lumière rouge n'étaient pas affectées par ce traitement photodynamique lorsque l'illumination avait lieu à la 24ème heure. Le Photofrin® a démontré son efficacité pour le traitement des tumeurs malignes[482]. Il est à l'origine d'une photosensibilisation prolongée de plusieurs semaines contraignant les patients à se protéger de la lumière[251,483]. La porphyrine de synthèse RGD utilisée a montré une efficacité *in vitro* comparable à celle du Photofrin® sur les mélanocytes B16F10 et une clairance d'élimination plus rapide. Les effets systémiques pourraient être minimaux.

La porphyrine de synthèse RGD testée est excitable en lumière rouge et en lumière bleue.

Mc Cullough *et al* démontraient que le Photofrin® pouvait être également activé par ces deux types de lumière[484]. L'absorption de la lumière est 1,5 à 3,5 fois supérieure avec la lumière bleue ou verte par rapport à la lumière rouge[485]. Ce constat permettait de diminuer les temps et les doses de Photofrin lorsqu'était utilisée une lumière bleue par rapport à la lumière rouge.
L'étude de la température lors des illuminations en lumière rouge et bleue ne révélait pas d'élévation significative de la température dans notre étude. L'utilisation de faible intensité permettait de minimiser le rôle de la température pour expliquer l'efficacité de la PTD[486].
Pour optimiser les paramètres du protocole d'illumination, nous avons cherché à déterminer la localisation cellulaire de la porphyrine. L'existence du résidu RGD pouvait nous laisser supposer une fixation rapide sur l'intégrine de surface cible $\alpha_V\beta_3$ et ainsi permettre d'adapter le temps d'incubation. Les techniques de microscopie confocale et de microscopie à fluorescence ne nous ont pas permis d'observer les porphyrines. Il est probable que la fluorescence demeurait trop faible pour être détectée ou que la source lumineuse provoquait une photodestruction trop rapide la porphyrine. Le rôle de la mélanine comme filtre lors de l'émission ou de l'excitation est possible puisque d'autres auteurs sur des cellules non pigmentées arrivaient à obtenir une fluorescence en microscopie à fluorescence[487]. Cependant, Vena et al démontraient que l'AAL se fixait préférentiellement sur les mitochondries en utilisant la microscopie à fluorescence sur des mélanocytes B16[139].
La PTD avec cette nouvelle porphyrine de synthèse était capable de diminuer la viabilité cellulaire des B16F10 et EJG. Le type de mort cellulaire n'a pu être élucidé. La recherche d'une nécrose par l'augmentation de la production de LDH n'a pu être mise en évidence de même que des phénomènes d'apoptose. Certains auteurs avaient rapporté des phénomènes de mort par nécrose et une diminution de la réplication de l'ADN après une PTD avec la phthalocyanine d'aluminium[334].
La cible du PS reste obscure. Il existe une interaction efficace entre l'agent photosensibilisant et certains composants cellulaires (mitochondries, noyaux). Plusieurs études ont démontré que les membranes cellulaires (plasmatique, mitochondriale ou nucléaire) représentaient des cibles privilégiées de la PTD[216]. Les dommages membranaires étaient des résultats de peroxydation lipidique provoquée par la production d'ERO lors de la photoréaction de type II. La réaction était à l'origine d'une dépolarisation membranaire et d'une activation de la phospholipase C[488]. Cependant, la plupart des études *in vitro* démontraient une mort cellulaire directe[489].

Afin de diminuer les doses et les concentrations nécessaires de porphyrines de synthèse RGD, puisque les concentrations efficaces *in vitro* étaient pharmacologiquement

élevées et pouvaient être un frein au développement *in vivo*, les évaluations ont été faites en lumière bleue. L'utilisation d'une lumière bleue permettait d'envisager des doses de PS moins importantes. Elle pouvait limiter les puissances d'illumination et lors des futurs tests *in vivo* et permettait d'avoir une source lumineuse responsable de moindres sensations douloureuses lors des séances.

L'exposition en lumière bleue a permis de montrer que les cellules B16F10 témoins sans TG-RGD et illuminées par la lampe Waldman 450L étaient freinées dans leur croissance témoignant d'une phototoxicité directe de cette lumière. La porphyrine exposée à la lumière bleue était détruite pour moitié de sa concentration initiale en moins d'une minute d'exposition. Cette instabilité et cette photodestruction de la porphyrine nous conduisirent à tenter d'éclaircir les mécanismes de la photocytotoxicité de la lumière bleue sur les B16F10.

E- Conclusion

Dans cette étude, nous avons démontré un effet photodynamique directe d'une porphyrine de synthèse, enrichie en groupement glucidique et vectorisée par le motif RGD, la Triglucosylporphyrine-RGD, hydrosoluble en lumière rouge. On notait un effet direct de la PTD sur les B16F10 et EJG. La PTD avec cette porphyrine de synthèse causait une diminution significative de la viabilité des deux populations de cellules étudiées. L'efficacité de cette porphyrine de synthèse est comparable à la molécule de référence le Photofrin ® avec cependant une clairance d'élimination bien plus rapide. Le mécanisme de mort cellulaire observée n'a pas pu être élucidé. Et les tentatives de localisation par des techniques d'imagerie n'ont pas permis de comprendre et de localiser la porphyrine au niveau cellulaire. Les réponses à la PTD de cellules tumorales ou normales varient selon les PS et leur propriétés, les sources lumineuses et leurs paramètres de réglage ce qui rend la compréhension des mécanismes de mort ou ralentissement de la croissance difficile à identifier.

L'intensité lumineuse de 10 J/cm^2 utilisée en lumière bleue a été à l'origine d'une photodestruction massive de la porphyrine de synthèse et a ensuite donné naissance à un nouvel axe de recherche parallèle pour expliquer la photocytotoxicité de la lumière bleue sur les B16F10.

Chapitre IV. Phototoxicité de la lumière bleue

A-Introduction

La lumière bleue seule est capable de provoquer la mort cellulaire par différents types de mécanismes. Cette photosensibilité à la lumière est différente selon les types cellulaires, le cycle cellulaire et les conditions d'illumination. Son rôle dans le développement de la DMLA a été prouvé par de nombreuses études ces dix dernières années. Les mélanocytes sont sensibles à cette lumière puisque la photothérapie néonatale a été récemment incriminée dans le développement de naevus. Et les mélanocytes *in vitro* voient leur croissance ralentie lors des expositions à la lumière bleue. Ces constats nous ont conduit à tenter d'élucider les mécanismes expliquant la phototoxicité de la lumière bleue sur les mélanocytes tumoraux murins et sur des cellules endothéliales bovines.

1. La lumière bleue

Les effets biologiques de la lumière bleue chez les mammifères ont été suggérés dès le XIX^{ème} siècle. La lumière bleue (380-500 nm), chez les plantes, induit des phosphorylations[490]. Elle possède une action anti-mitotique sur les cellules rénales de porc[393]. Elle est utilisée pour polymériser des biomatériaux, en médecine dentaire. Depuis plusieurs années, la lumière bleue est employée comme agent thérapeutique. Elle est capable d'interrompre les processus cellulaires comme les mitoses[393], de perturber le fonctionnement mitochondrial[394], et compromettre l'intégrité du génome[395] en induisant la production d'espèces réactives de l'oxygène. La lumière bleue peut provoquer des lésions de l'ADN mitochondriale en produisant des radicaux libres au sein de cellules épithéliales[491]. Récemment, Liebman *et al* démontraient que la lumière visible d'une longueur d'onde de 632-940 nm n'avait pas d'effet sur la viabilité et la prolifération des cellules cutanées humaines. A l'inverse, ils notaient que la lumière bleue (412-426 nm) était toxique à forte intensité. L'illumination avec des longueurs d'onde de 412, 419, 426 et 453 à des doses de

66-100 J/cm^2 et de plus de 500 J/cm^2 provoquait une phototoxicité sur les cellules endothéliales et kératinocytaires. Des doses inférieures engendraient une diminution ou une augmentation de la prolifération [492].

2. La photocytotoxicité de la lumière bleue sur les mélanocytes tumoraux

Le rôle de la lumière bleue est controversé dans la littérature. Certains auteurs ont démontré une phototoxicité de la lumière sur les mélanocytes tumoraux et suggèrent la possibilité de traiter par lumière bleue les mélanomes. A l'inverse, d'autres ont observé une accélération de la prolifération des mélanocytes normaux et tumoraux. La phototoxicité est indéniable mais les mécanismes restent non élucidés. Le stade cellulaire auquel la cellule est soumise à l'illumination pourrait jouer un rôle en orientant la cellule vers une voie de prolifération ou de mort par exemple. Le rôle des UV dans l'induction des tumeurs cutanées est largement démontré dans la littérature. Dans la lumière bleue, il existe une partie d'émission d'UV. Ce constat pourrait être à l'origne des transformations.

La lumière bleue a une haute énergie et peut pénétrer dans les tissus. Elle a été associée à l'apparition de mélanomes chez des modèles animaux[493,494]. Elle semble être responsable de l'augmentation du nombre de naevus chez les enfants ayant eu une photothérapie néonatale pour traiter un ictère[386]. Plusieurs études suggèrent que l'exposition à la lumière bleue jouerait un rôle dans la transformation maligne des mélanocytes choroïdiens. En effet, l'exposition prolongée des rats à la lumière bleue est à l'origine du développement de mélanomes choroïdiens[417]. L'utilisation d'un filtre UV capable de bloquer l'arrivée oculaire de la lumière bleue sur des mélanocytes choroïdiens malins permettait de diminuer la prolifération cellulaire[416].

La lumière bleue est capable d'interrompre les mitoses et l'activité mitochondriale[393,394]. Plusieurs études évoquent la production d'ERO lors d'exposition à la lumière bleue provoquée par l'interaction de chromophores endogènes (cytochromes, flavines, hautes concentrations de chromophores mitochondriaux[396,495]. Elle a donc été proposée pour le traitement des cancers, comme le mélanome, le glioblastome, les carcinomes épidermoïdes, et les adénocarcinomes mammaires[496,497].

Les travaux de l'équipe d'Ohara *et al* suggèrent des effets anti-tumoraux de la lumière bleue sur des cellules tumorales en culture, dont les mélanocytes tumoraux murins B16F10. Ils concluent à une mort par nécrose induite par la production massive d'ERO et la production de

péroxyde d'hydrogène formé par la réaction de la riboflavine (présente dans le milieu de culture) et la lumière bleue[498].

L'exposition à la lumière bleue semblait bloquer la production de mélanine par les B16F10 lorsque les rats étaient soumis ensuite à des séances répétées d'UVB[499]. Cette inhibition de la prolifération des B16 se maintenait lorsque les cultures étaient poursuivies sur plusieurs passages. L'exposition à la lumière provoquait des altérations importantes des colonies cellulaires avec la formation de petites colonies de cellules dysmorphiques[496]. Ces résultats suggéraient que l'exposition à la lumière bleue pouvait modifier les fonctions des mélanocytes tumoraux murins B16F10. Des travaux émanant de la même équipe démontraient la freination de la formation de métastases pulmonaires sur des modèles animaux[500]. Il apparaissait que l'effet de la lumière bleue sur la B16F10 était lié à une inhibition de la synthèse d'ADN et de la division cellulaire.

La lumière violette de longueur d'onde proche de celle de la lumière bleue pourrait provoquer un « bleaching » de la mélanine et permettrait d'optimiser l'efficacité de la PTD en lumière rouge chez la souris nude[501]. La lumière bleue est 30 fois plus efficace que la lumière jaune pour créer des dommages sur l'épithélium pigmentaire rétinien[502].

3. Les cryptochromes, photorécepteurs à la lumière bleue

En réponse aux changement des conditions de lumière dans la nature, et afin d'optimiser leur croissance et leur développement, les plantes possèdent des récepteurs à la lumière rouge et aux infrarouges, les phytochromes, et des récepteurs à la lumière bleue et UV-A, les cryptochromes et enfin des récepteurs aux UV-B. Les plantes ont des comportements différents lorsqu'on les expose à la lumière bleue en utilisant leurs cryptochromes : par exemple, l'inhibition de la pousse de l'hypocotyle d'une plante, *l'Arabidopsis thaliana*. Chez les plantes, la lumière bleue est aussi capable de phototropisme (croissance unidirectionnelle en réponse à un stimulus unilatéral), d'ouvrir les stomates, de produire des anthrocyanes et permettre l'expression de certains gènes[503].

Les UV sont capables de provoquer des lésions mutagènes de l'ADN, en particulier la formation de dimères de pyrimidines (CPD, Cyclobutyl pyrimidine dimère) et un photoproduit (6-4 pyrimidine-pyrimidone). Il existe une voie de réparation de l'ADN dénommée photoréactivation chez les végétaux. Elle fait intervenir des enzymes, appelées photolyases, se liant au brin d'ADN lésé et activées par l'absorption de la lumière bleue, qui

catalysent la restauration de deux pyrimidines intactes[504]. La protéine activée excite un cofacteur, la flavine, qui peut transférer un électron au dimère de pyrimidine entrainant la scission de ce dimère et la réparation de l'ADN.

Le cryptochrome est un photorécepteur de la lumière bleue observé dans les règnes végétal et animal et chez l'homme[411]. Il joue un rôle clé dans le rythme circadien[505]. Les études génétiques de *l'Arabidopsis thaliana* ont permis d'identifier 3 photorécepteurs à la lumière bleue : cryptochrome 1, cryptochrome 2 et la phototropine[506]. Deux cryptochromes ont été décrits chez l'homme : *h*CRY1 et *h*CRY2[507,508]. Ils dérivent d'une ancienne protéine, une photolyase qui activée par la lumière est capable de réparer l'ADN[509]. Malgré leur homologie structurale avec les photolyases, ces cryptochromes, qui sont des flavoprotéines, n'ont pas la capacité de réparer l'ADN[510-512].

Sur le plan biochimique, ces flavoprotéines sont des protéines monomères solubles de 600 acides aminées et 50 à 70 kDa. Elles possèdent deux domaines N-Terminale (photolyase homology région, PHR) de 500 acides aminés et un domaine C-Terminale de taille variable de 30 à 350 acides aminés. Le domaine PHR lie deux chromophores, une flavine adénine dinucléotide (FAD) (chromophore catalytique) et un 5, 10-méthenyltetrahydrofolate (ptérine).

Le cryptochrome utilise la flavine adénine dinucléotide comme cofacteur et participe à la régulation des rythmes circadiens. La photoactivation, déclenchée par la lumière visible, transforme FAD sous une forme doublement réduite ($FADH^-$) à partir de la forme semi-réduite ($FADH^\circ$) (Fig-39)[513]. Les cryptochromes sont transmembranaires. Après excitation par un rayonnement lumineux bleu, il se produit un mouvement d'électrons, la membrane se dépolarise, la protéine se détache et migre vers le noyau.

Chez les plantes, la localisation du CRY1 dépend de l'exposition à la lumière. Il est dans le cytoplasme à la lumière et dans le noyau à l'obscurité. Quant à CRY2, il reste dans le noyau[514]. Le CRY2 est exprimé par les cellules rétiniennes humaines, se localise dans le cytoplasme de cellules de la couche ganglionnaire et joue un rôle de photorécepteur (Fig-80)[515]. Ces cryptochromes ont une localisation cellulaire différente chez la souris, le CRY1 se situe dans la mitochondrie et le CRY2 se localise dans le noyau[508]. Les cryptochromes de souris interviennent dans la régulation des rythmes circadiens.

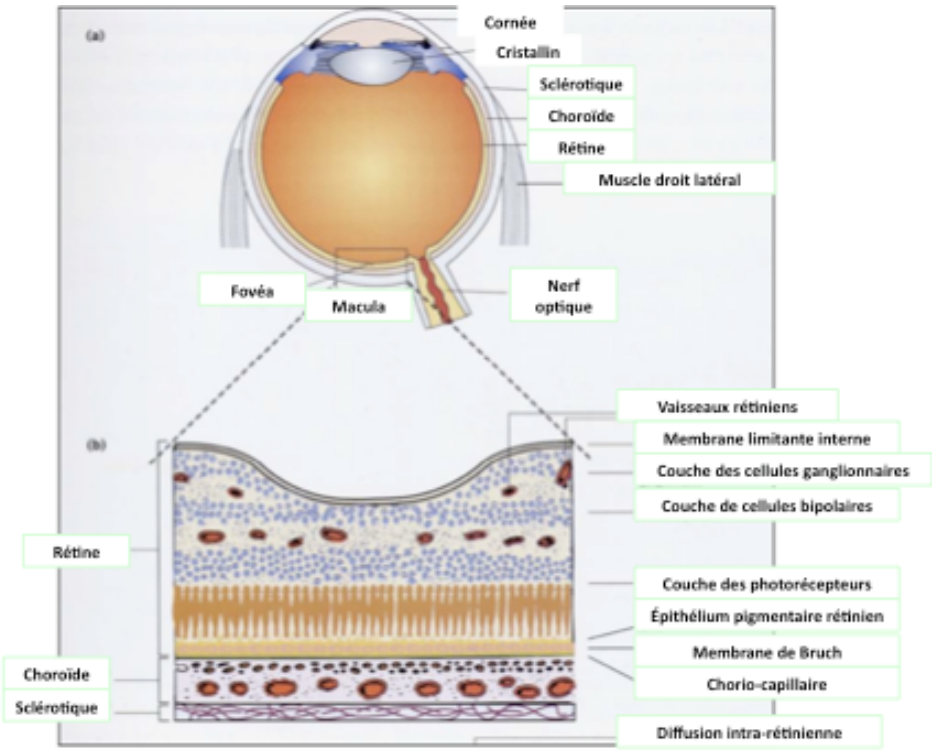


Figure 80- Structure de l'œil

Les cryptochromes humains *h*CRY1 et *h*CRY2 sont localisés dans la noyau cellulaire et interagissant avec la phosphatase PP5[516,517]. La protéine *h*CRY2 inhibe spécifiquement l'activité de la PP5 *in vitro*, donc entraine un effet anti-prolifératif et l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1[518,519].

4. Photocytotoxicité de la lumière bleue sur des mélanocytes tumoraux murins et sur des cellules endothéliales.

De nombreuses études se sont intéressées aux effets biologiques des UV sur différents systèmes biologiques. A l'inverse, peu de travaux ont étudié les effets directs de la lumière visible. La lumière bleue semble inhiber la croissance de mélanocytes tumoraux murins B16F10 en réduisant le nombre de cellules en phase S du cycle cellulaire.

Le mélanome est une tumeur maligne hautement résistante aux agents chimiothérapiques et de nouvelles approches sont nécessaires spécialement pour traiter les métastases sous cutanées.

En photothérapie dynamique, la source lumineuse la plus souvent utilisée compte tenu de son excellente pénétration en profondeur est la lumière rouge.

La lumière bleue est plus rarement utilisée en PTD car elle pénètre moins profondément dans les tissus. Les effets de la lumière bleue sont principalement employés chez l'homme pour traiter l'ictère du nouveau-né[520].

Finalement, très peu d'études ont montré que la lumière bleue pouvait interrompre les mitoses et compromettre l'activité mitochondriale[393]. D'autres études ont révélé que la lumière bleue aurait une activité cytostatique sur les B16[496].

Lockwood *et al* a démontré que la lumière bleue induisait la production d'espèce réactive de l'oxygène (ROS) au sein des cellules épithéliales[521]. C'est pourquoi la lumière bleue a été proposée pour traiter des carcinomes épidermoïdes et des mélanomes. Mais les mécanismes par lesquels la lumière bleue agit sur des cibles biologiques et provoque des dommages cellulaires demeurent encore mal élucidés.

Dans ce travail, les effets de la lumière bleue et de la lumière rouge sur les mélanocytes tumoraux murins B16F10 et des cellules endothéliales capillaires bovines étaient étudiés. Et un patient atteint de métastases cutanées hémorragiques de mélanome était traité par la lumière bleue.

B-Matériel et Méthodes

1. Les cellules B16F10 et les cellules endothéliales EJG

Les deux lignées cellulaires utilisées étaient préalablement décrites et les conditions de cultures explicitées précédemment.

2. Les sources lumineuses

Deux types de lampe étaient utilisés. La lampe Waldmann ™ PDT 450 L permettait une illumination en lumière bleue d'une longueur d'onde comprise entre 380 et 470 nm et un maximum à 420 nm.
La lampe PhotoDyn 501 ™ Cosmedico permettait l'illumination en lumière rouge avec un spectre compris entre 600 et 1400 nm et un maximum à 800 nm en utilisant un filtre orange.

3. Le protocole d'illumination

Les cellules étaient ensemencées à une densité de 10^5/ml dans des plaques de 96 puits après trypsinisation. Après 48h, les cellules étaient lavées avec du PBS et incubées pendant 2h avec du milieu DMEM complet en atmosphère humide avec 5% de CO_2 et à 37°C. Aucun agent photosensibilsant n'était ajouté dans les puits. Les cellules étaient illuminées en lumière bleue avec la lampe PDT 450L Waldmann à 450 nm et en lumière rouge avec la lampe PhotoDyn 501 Cosmedico à 800 nm dans une pièce chauffée à 25°C. La dose délivrée était de 10 W/cm^2. Le temps d'exposition était ajusté pour obtenir une dose énergétique de 50 J/cm^2 en lumière rouge et 10 J/cm^2 ou 20 J/cm^2 en lumière bleue. La distance entre les tubes lumineux des sources et les cellues était de 37 cm (lumière bleue) et de 25 cm (lumière rouge). Pendant l'illumination, la température était monitorée.

4. Etude de cytotoxicité et de photocytotoxicité par le test MTT

La viabilité cellulaire était mesurée par le test MTT [3-(4.5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium bromide) précédemment décrit.

Les mesures de densité optique étaient réalisées avant, immédiatement après l'illumination, puis 24h, 48h et 72h après la fin de l'illumination. A la fin de chaque temps, 50 µl de solution de PBS-MTT (1,5 mg/ml de PBS) était ajouté et une incubation de 1h était effectuée à 37°C. Au bout d'une heure, le DMSO était ajouté dans tous les puits et une incubation de 15 min à 37°C était effectuée selon la méthode de Mosmann *et a*l [476]. Les densités optiques étaient lues avec un lecteur de plaque ELISA à 570nm (Multiskan® EX, Microplate photometer). Chaque mesure était réalisée en triplicate.

5. Etude de la peroxydation lipidique après illumination en lumière bleue

La peroxydation lipidique est l'oxydation des lipides insaturés, catalysée par une enzyme peroxydase.

L'étude de la peroxydation lipidique dans les mélanocytes B16F10 était effectuée en mesurant la quantité d'acide thiobarbiturique formé (TBARS, **T**hio**B**arbituric **A**cid **R**eactive **S**ubstance). Les substances issues de la peroxydation lipidique, MDA (malondialdéhyde) et des lipides hydroxyperoxides réagissent avec l'acide thiobarbiturique (TBA) pour former des TBARS, détectable en spectrophotométrie à 532 nm.

La réaction est favorisée par des conditions acides et à haute température.

Les cellules traitées à la concentration de 5 millions de cellules /ml étaient mélangées avec 500µl d'acide trichloracétique à 10% contenant 0,5% d'acide thiobarbiturique (TBA). Le mélange ainsi obtenu était chauffé à 95°C pendant 40 minutes. La réaction était ensuite stoppée en plongeant les tubes dans de la glace. Le complexe coloré était extrait en ajoutant 1ml de n-butanol puis visualisé à 532 nm sur le spectrophotomètre Shimadzu (UV-2401PC). La concentration en TBARS formés était exprimée en nmol de MDA/million de cellules en utilisant MDA comme standard.

6. Etude de la fragmentation de l'ADN par la méthode du DAPI après illumination en lumière bleue

Les cellules mélanocytaires tumorales murines B16F10 étaient cultivées sur lamelles circulaires de verre dans des plaques de 24 puits et ensemencées à une densité de 6000 cellules/puits. Elles étaient exposées à 10 J/cm2 de lumière bleue. Les fixations et les observations étaient réalisées à des temps variables (T0, H1, H3, H12, H24 et H48) après l'illumination. Le milieu de culture était retiré et les cellules étaient rincées deux fois au PBS1X. Les cellules étaient alors fixées avec le PFA à 4% pendant 20 minutes à température ambiante. Les cellules étaient ensuite rincées 2 fois au PBS1X. Les lamelles étaient incubées avec 500µl de DAPI pendant 5 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière. Un rinçage des lamelles au PBS était effectué avant de les fixer avec une goutte de montage Immumount (Shandon-Immumount, Pittsburgh). Après une nuit de séchage à 4°C, les lames étaient observées au microscope à fluorescence avec un filtre UV (excitation 358 nm, émission 461 nm).

7. Etude des phénomènes de nécrose par la détection de production de LDH

La lactate déshydrogénase (LDH) est une enzyme cytoplasmique présente dans toutes les cellules. Elle est libérée dans le surnageant de culture de cellules lorsqu'il y a un dommage de la membrane plasmique. La quantification de l'activité LDH libérée par les cellules endommagées était utilisée par un dosage colorimétrique. Un kit de détection de cytotoxicité (Roche Applied Science) était utilisé pour apprécier le degré de nécrose en utilisant la capacité des cellules à libérer les LDH lors de la lyse cellulaire.

Après traitement en lumière bleue, les cellules B16F10 et le surnageant étaient récupérées immédiatement et incubées avec le substrat INT (sel de tétrazolium) au formazan coloré. De la même manière plusieurs temps étaient étudiés (T0, H1, H3, H12, H24 et H48). Puis grâce à un lecteur de plaque ELISA, le colorant était quantifié.

8. Analyse statistique

Les données ont été exprimées en moyenne +/- DS. Pour comparer le groupe de cellules traitées par la lumière visible (rouge ou bleue) et le groupe de cellules non traitées « contrôles », le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour détecter les différences.

C- Résultats

1. Etude de la photocytotoxicité de la lumière bleue et rouge sur des lignées de mélanocytes tumoraux murins et sur les cellules endothéliales capillaires bovines.

Les mélanocytes B16F10 maintenus à l'obscurité restaient viables et poursuivaient leur croissance.

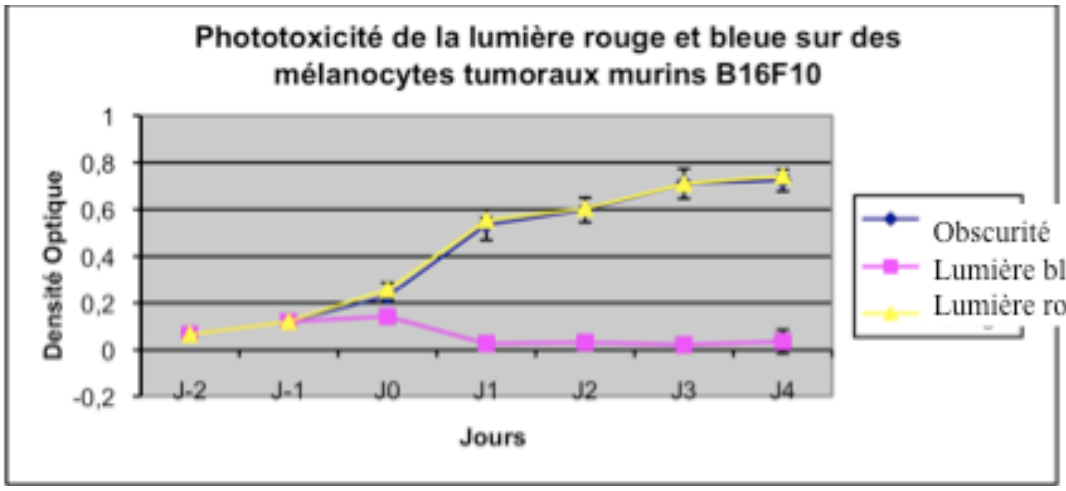


Figure 81 - Etude de la Photocytotoxicité de la lumière visible (lumière rouge versus lumière bleue versus obscurité) sur les mélanocytes tumoraux murins B16F10

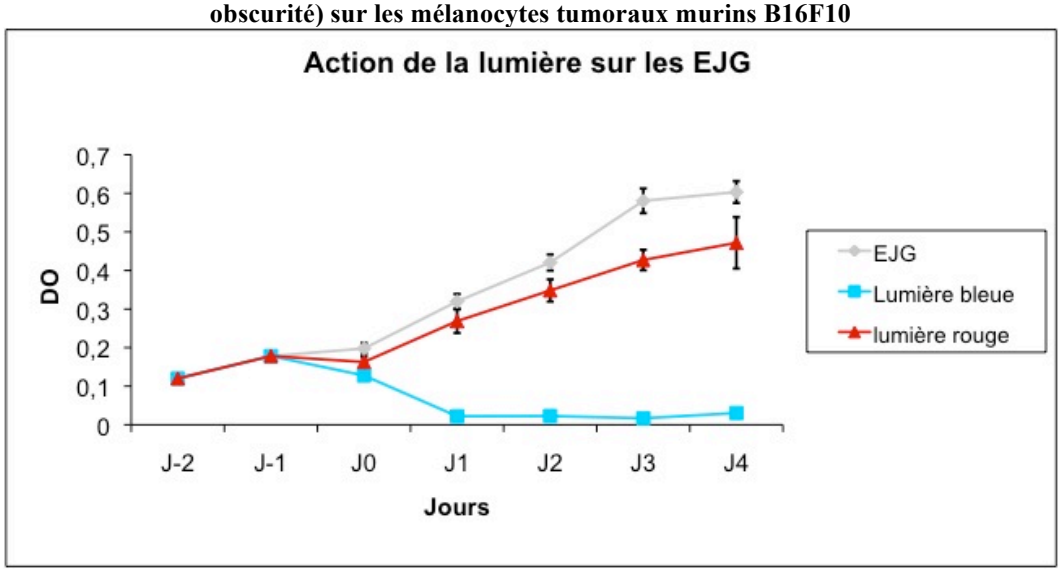


Figure 82 - Etude de la Photocytotoxicité de la lumière visible (lumière bleue versus lumière rouge versus obscurité) sur les cellules endothéliales capillaires bovines EJG

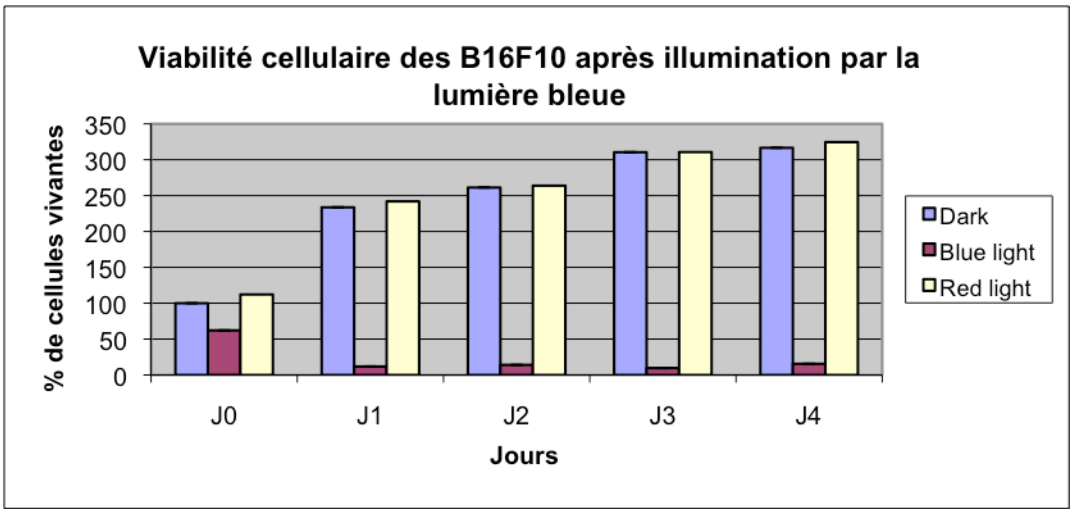


Figure 83- Pourcentage de cellules vivantes après l'exposition à 50J/cm^2 en lumière rouge et 20J/cm^2 en lumière bleue.

La croissance des cellules B16F10 exposées à la lumière bleue diminuait rapidement après l'illumination dès la 24ème heure et était évaluée par le test de viabilité colorimétrique MTT.

Le nombre de cellules B16F10 mortes dans le groupe traité par la lumière bleue était significativement plus élevé entre le Jour 0 et le Jour 4 par rapport au nombre de cellules mortes du groupe contrôle maintenu à l'obscurité ($p< 0,0001$) (Fig-81). Aucune photocytotoxicité n'était observée sur les B16F10 exposés à la lumière rouge par rapport au groupe contrôle ($p=0,29$).

Le taux de mortalité cellulaire des B16F10 était significativement plus important pour les cellules illuminées en lumière bleue par rapport à celles illuminées en lumière rouge du Jour 1 au Jour 4 ($p<0,0002$) (Fig-82). Aucune reprise de la croissance n'était observé dans les jours suivant l'illumination par la lumière bleue.

De plus, la lumière bleue augmentait significativement la mortalité des cellules endothéliales capillaires bovines EJG dans les 24h post-illumination par rapport au groupe contrôle ($p<0,0001$). La lumière rouge apparaissait moins phototoxique sur les cellules endothéliales EJG par rapport à la lumière bleue (Fig-83). La lumière rouge n'entraînait pas de mort cellulaire mais il existait une différence significative de croissance entre les cellules endothéliales exposées à la lumière rouge et celles maintenues à l'obscurité ($p<0,05$).

2. Etude de la peroxydation lipidique des mélanocytes tumoraux murins B16F10 illuminés en lumière bleue à 10 J/cm^2 et 20 J/cm^2.

La peroxydation lipidique des cellules B16F10 exposées à la lumière bleue, à 10 J/cm^2 et 20 J/cm^2, sans illumination et un témoin contenant seulement du milieu DMEM était analysée.

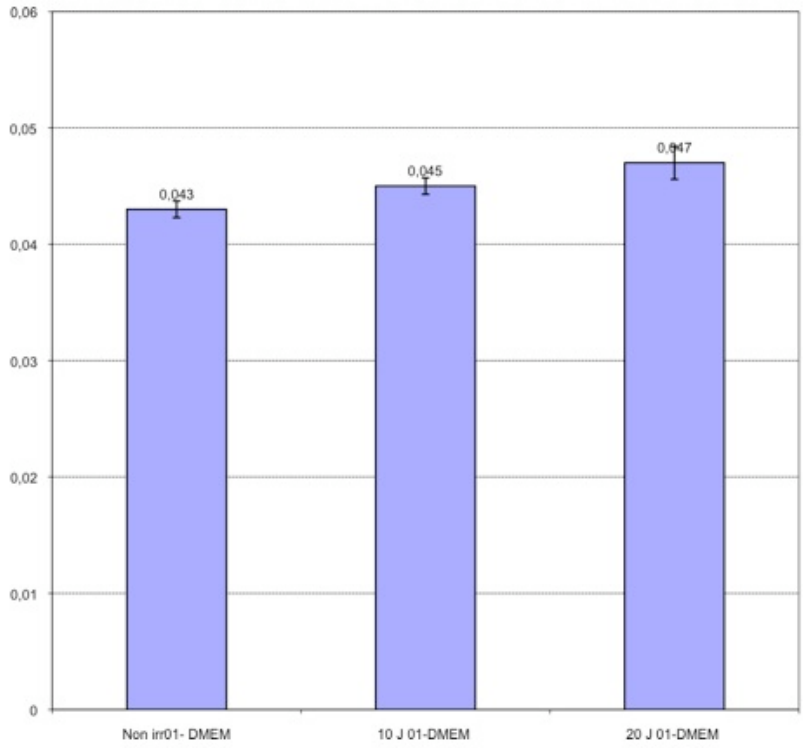


Figure 84 - Etude de la peroxydation lipidique des B16F10 illuminée par de la lumière bleue à 10 et 20 J/cm^2

Aucun dommage oxydatif n'était observé après exposition à la lumière bleue (Fig-84).

3. Etude de la variation de la température pendant l'illumination

La température ambiante avant et après l'illumination en lumière bleue était mesurée. Une élévation négligeable de la température était notée de 26°C +/- 1,5°C avant l'illumination à 28°C+/- 1,3°C après l'illumination. Plusieurs mesures étaient enregistrées afin d'établir une température moyenne.

4. Etude de la fragmentation de l'ADN par DAPI après l'illumination en lumière bleue des B16F10.

Le DAPI ne montrait pas de fragmentation du noyau 12h après et 24h après les séances par rapport aux cellules témoins non traitées

5. Etude de la photocytotoxicité par détection de la production de LDH après exposition à la lumière bleue des B16F10

Aucune production de LDH n'avait pu être mise en évidence par le Kit de nécrose après traitement des cellules par la porphyrine de synthèse.

6. Etude in vivo de l'efficacité de l'illumination en lumière bleue de métastases cutanées de mélanome.

Un patient âgé de 81 ans était hospitalisé en octobre 1999 pour la prise en charge d'un mélanome du pouce droit. Le pouce était amputé avec des marges chirurgicales de sécurité. L'histologie cutanée confirmait le diagnostic de mélanome avec un indice de Breslow de 3,8 mm et un niveau IV de Clark. Les explorations radiologiques pulmonaires et échographiques hépatiques étaient normales au stade initial de la maladie. Deux ans plus tard, des métastases cutanées apparaissaient sur l'avant-bras droit. Le scanner thoracique révélait des métastases pulmonaires multiples. Quatre cures de dacarbazine étaient réalisées. Une progression tumorale pulmonaire était notée et 7 cycles d'une deuxième ligne de chimiothérapie associant cisplatine et vindésine étaient administrés au patient permettant la réduction de 20 à 50% du nombre de métastases pulmonaires et la régression des métastases cutanées. Il était suivi tous les 3 mois.

Figure 85 - Métastases cutanées de mélanome ulcérées et hémorragiques de l'avant-bras droit avant illumination en lumière bleue à 20 J/cm^2

Figure 86 - Aspect clinique des métastases cutanées de mélanome, moins hémorragiques et blanchâtre en surface après 5 jours consécutifs d'exposition à la lumière bleue à 20 J/cm^2

Un an plus tard, le patient était réadmis dans le service de dermatologie pour la réapparition de métastases cutanées sur l'avant-bras et d'une adénopathie axillaire homolatérale ferme et suspecte.

Après la lymphadenectomie, le traitement était complèté par une radiothérapie du creux axillaire droit et des injections sous cutanées d'interféron alpha 2b à la dose de 3 millions d'unité trois fois par semaine pendant 3 mois. Malgré ce traitement, on observait l'extension en nombre et en taille des métastases cutanées de l'avant-bras et du bras droit. Les

explorations scannographiques thoraco-abdomino-pelvien et cérébrales ne révélaient que les métastases pulmonaires connues et stables.

Quatre cures de chimiothérapie combinant le cisplatine et la vindésine étaient réalisées. Une nouvelle évaluation clinique et radiologique montrait une progression lente des lésions tumorales cutanées et pulmonaires. Sept cures de chimiothérapie par bélustine étaient instituées. Les métastases cutanées touchant l'ensemble du membre supérieur droit devenaient douloureuses avec un retentissement sur la qualité de vie du patient. Elles étaient épaisses, ulcérées et hémorragiques.

Le patient acceptait l'illumination en lumière bleue des métastases cutanées de la face antérieure de l'avant-bras après obtention d'un consentement libre et éclairé. L'illumination était réalisée avec la lampe Waldman PDT 450L. Le patient avait une illumination journalière en lumière bleue (450 nm) à 20 J/cm^2 5 jours consécutifs par semaines pendant 2 semaines.

La taille de la métastase cible était de 2,8 x 3 cm avant l'expostion (Fig-85) et diminuait à 2 x 2,4 cm à l'issue des deux semaines de traitements.

L'état de la peau adjacente aux métastases était évalué sur l'érythème, l'œdème, les bulles, la nécrose et la douleur. L'apparition de nouvelles lésions dans la zone cible était monitorée. Avec l'accord du patient, les photographies étaient prises avant et 2 semaines après le début du traitement.

Pendant le traitement, le saignement invalidant était rapidement stoppé et la croissance tumorale semblait être ralentie par rapport aux tumeurs non illuminées au bout des 15 jours de traitement par lumière bleue (Fig-86). Une nécrose clinique représentée par un aspect livide et blanchâtre et l'élimination de débris au bout de 24h était observée. La taille de la métastase cible diminuait de 2 mm après 5 jours d'illumination et 7 mm en moyenne après 10 jours d'exposition journalière.

L'illumination possible qu'en milieu hospitalier n'avait pu être maintenue au delà de 15 jours. Le saignement et la reprise de la croissance tumorale des cibles exposées n'étaient à nouveau observées qu'au bout d'un mois.

D- Discussion

Cette étude a confirmé que la lumière bleue a permis la destruction *in vitro* des mélanocytes tumoraux murins B16F10 et des cellules endothéliales capillaires bovines EJG. L'hypothèse retenue était une inhibition de la croissance cellulaire parce que les cellules survivantes observées post-illumination étaient devenues incapables de se diviser pendant les 4 jours suivant le traitement.

La lumière rouge n'influençait pas la croissance cellulaire des mélanocytes B16F10 mais était photocytotoxique pour les cellules endothéliales EJG. Il existait un ralentissement de la croissance significative entre les cellules EJG exposées à la lumière rouge et celles maintenues à l'obscurité. Cette observation suggère que l'association d'un photosensibilisant et d'une illumination en lumière rouge est une excellente combinaison pour la destruction des vaisseaux et de la néovascularisation tumorale en photothérapie dynamique. Par alleurs, cela permet de confirmer que les cellules ne réagissent pas de manière similaire aux différentes lumières du spectre visible.

Une importante réponse photocytotoxique des cellules endothéliales après expostion à la lumière bleue a été notée. C'est pour cette raison qu'une thérapie par la lumière bleue sans adjonction de PS a été proposée au patient après l'obtention d'un consentement libre et éclairé. Des résultats positifs étaient obtenus au bout de 2 cycles de 5 jours d'illumination journalière de métastase cible de la face antéreiure de l'avant-bras droit. Une nécrose superficielle de la métastase cible était notée 24h après la première illumination avec une élimination d'une fine couche de débris cellulaires. Le saignement de la tumeur s'interrompait immédiatement après l'illumination alors que les métastases non illuminées et maintenues à l'obscurité sous un champ opératoire stérile continuaient de saigner.

Ohara *et al* rapportait une inhibition de la croissance des B16F10 lorsqu'elles étaient exposées à la lumière bleue, une des couleurs primaires du spectre de la lumière visible[496]. Ces résultats indiquaient que la lumière bleue avait un effet cytostatique mais pas cytotoxique sur les mélanocytes tumoraux murins B16F10. Les auteurs suggéraient que l'effet « inhibiteur » de la lumière bleue sur la croissance des B16F10 était probablement lié à une action sur le cycle cellulaire en bloquant la progression de la phase G1 vers la phase S et en allongeant la phase M[496]. Dans leur étude, aucune photocytotoxicité de la lumière rouge n'était observée.

La phototoxicité de la lumière bleue a été observée avec d'autres types de lignées cellulaires différentes. La croissance cellulaire est significativement diminuée lors de l'exposition de

cellules leucémiques humaines HL60 à la lumière bleue alors qu'à l'inverse les lymphocytes normaux restaient insensibles à l'illumination [522].

La même équipe montrait que la lumière bleue pouvait affecter le potentiel métastatique des cellules tumorales[500]. Ces résultats suggéraient que la thérapie par la lumière bleue pouvait être une perspective intéressante pour le traitement des tumeurs malignes cutanées. Dans notre étude, la lumière bleue montrait un important et rapide effet cytotoxique plus qu'un blocage du cycle cellulaire que notait Ohara *et al*. Comme Godley *et al*, nous avons suggéré que la phototoxicité de la lumière bleue est liée à des dommages de l'ADN mitochondrial et à la production de radicaux libres au sein des cellules épithéliales non pigmentées[491].

L'exposition à la lumière bleue réduisait l'incidence et le nombre de papillomes induits par l'application de TPA (12-O-tétradecanoylphorbol-13-acetate) sur des souris transgéniques v-Ha-ras[523]. Les tumeurs cutanées apparaissaient logiquement comme des cibles pour le traitement par la lumière bleue lorsque les tumeurs sont nombreuses, superficielles, exposables à la lumière externe et inextirpables chirurgicalement.

La lumière bleue utilisée dans notre étude était probablement plus efficace que la lumière visible naturelle car l'intensité de la longueur d'onde précise et ciblée de 450nm pouvait correspondre au pic d'absorption d'une subtance intra-cellulaire non identifiée[524]. Un mécanisme complexe moléculaire encore inconnu serait capable de provoquer un blocage du cycle cellulaire dépendant de l'intensité lumineuse et induisant la mort cellulaire.

Les observations de Ohara *et al* montraient que la lumière bleue était à l'origine de la suppression de la mélanogénèse lorsque des souris étaient par la suite soumises à des séances répétitives d'UVB[499].

Par ailleurs, la riboflavine, contenue dans le milieu de culture DMEM, était capable d'augmenter les effets d'inhibition de la croissance des B16F10 de la lumière bleue en produisant des radicaux libres[498].

Lockwood *et al* observaient que la lumière bleue était capable d'induire la production d'espèces réactives de l'oxygène différemment dans les tissus épithéliaux sains et tumoraux[521]. Ces données sont intéressantes et suggèrent que la combinaison de la lumière bleue avec un PS augmenterait l'efficacité de la PTD par rapport à la lumière rouge. La lumière paraît être mieux tolérée et est largement absorbée par les porphyrines. Elle pourrait donc avoir une action synergique avec les porphyrines pendant la PTD malgré une faible pénétration en profondeur.

Notre étude s'oppose à plusieurs publications récentes dans lesquelles les auteurs rapportaient que l'exposition de cellules à la lumière bleue provoquait une augmentation de la prolifération

des cellules mélaniques choroïdiennes humaines par rapport à un groupe contrôle[416]. Des confusions existent au sein des publications sur la notion du spectre de la lumière visible et celle des UV. Les longueurs d'onde de la lumière bleue s'étendent de 450 à 490 nm et les UV de 100 à 400nm. Ces longueurs sont proches et le spectre d'irradiation n'est pas clairement décrit au sein des publications. C'est probablement parce qu'il existe au sein de la lumière bleue un peu d'UV, environ 10%. Cette confusion est probablement à l'origine des conclusions discordantes observées dans la littérature. Di Cesare *et al* rapportaient qu'une exposition à la lumière visible bleue pouvait influencer la progression des mélanomes choroïdiens mais sans préciser clairement le spectre de lumière utilisé[419].

Les mécanismes moléculaires et cellulaires d'action de la lumière bleue, incluant une photosensibilisation, une perturbation du cycle cellulaire et une mort cellulaire par apoptose ou nécrose demeurent encore non élucidés. Ils sont probablement influencés par la puissance de l'illumination et la nature, le type et l'état physiologique ou pathologique de la cellule exposée à un moment donné du cycle cellulaire. Le rôle de la lumière bleue sur l'histoire naturelle du mélanome humain mérite des études complémentaires.

L'importance et la brutalité de la mort cellulaire observée dans notre étude après l'illumination en lumière bleue suggèrent plus une mort par nécrose avec une production massive d'espèces réactives de l'oxygène qu'une mort cellulaire programmée, par apoptose.

L'hypothèse d'une peroxydation lipique était suggérée mais aucune n'était observée quelles que soient les doses de lumière bleue utilisées. Porebska-Budny *et al* avaient montré que la mélanine inhibait la peroxydation lipidique et protégeait contre les dommages photoinduits par les radicaux libres[525]. Ce constat nous suggère un autre mécanisme de mort cellulaire.

E- Conclusion

Notre étude confirme le rôle pathogène cellulaire de la lumière bleue sur les mélanocytes tumoraux murins B16F10 comme l'avait au début des années 2000 démontré l'équipe d'Ohara *et al*. Cependant, la compréhension du mécanisme reste non élucidée. Les doses de lumière bleue et le stade de développement de la cellule, son caractère tumoral ou non, primitif ou métastatique pourraient influencer la réponse. L'hypothèse de l'existence de récepteur à la lumière bleue, les cryptochromes, sur les mélanocytes cutanés pourrait être les perspectives d'un travail futur. En effet, la découverte de récepteurs sur les mélanocytes choroïdiens suggère cet axe de recherche.

Chapitre V. Etude des phénomènes d'Autophagie en Photothérapie Dynamique

A-Introduction

Pour se défendre contre les agressions extérieures et particulièrement les UV, la peau possède des capacités adaptatives grâce à ses particularités anatomiques et fonctionnelles. Les moyens de photoprotection naturelle de la peau sont constitués par la présence de la couche cornée. Elle assure la réflexion, la diffraction et l'absorption des rayons lumineux, mais également par la barrière mélanique où le mélanocyte joue un rôle clé.

Les mélanocytes sont responsables de la fabrication du pigment de la peau, la mélanine. Les mélanocytes, issus de la crête neurale, se situent dans la couche basale de l'épiderme. Ils sécrètent et transfèrent les mélanosomes (contenant la mélanine) aux kératinocytes, incapables de synthétiser ce pigment. Sous l'action des rayons UV, les mélanosomes se localisent en position supranucléaire de façon à protéger le matériel génétique. Ainsi, les mélanocytes sont responsables de l'élaboration de la « barrière mélanique » protégeant l'organisme des radiations solaires et de la lumière visible.

La mélanine avec son rôle de photoprotection représente un frein aux traitements utilisant les rayonnements en particulier à la lumière visible. Ce mécanisme de résistance pourrait s'expliquer également par le déclenchement d'un processus d'autophagie, de survie des mélanocytes soumis à ce stress environnemental.

L'utilisation de la photothérapie dynamique (PTD) se développe depuis quelques années et est à l'origine de travaux sur les mécanismes de mort cellulaire dans les mélanocytes. Cependant, les effets sur les mélanocytes sont peu étudiés, et peu de mélanomes sont traités par cette technique. En effet, la prise en charge de mélanomes cutanés par photothérapie dynamique s'est révélée jusqu'à présent décevant. La gravité de la lésion, mais aussi sa pigmentation (semblant s'opposer à une bonne pénétration de la lumière), peuvent expliquer ces résultats[501].

La PTD provoque des lésions cellulaires entrainant la mort cellulaire dans de nombreux tissus par réaction photochimique. Les photosensibilisants utilisés en PTD présentent l'avantage de se concentrer majoritairement dans les cellules tumorales ou à renouvellement rapide.

Toutefois chacun d'entre eux possèdent une longueur d'onde d'illumination spécifique lui permettant d'être excitée, mais peut expliquer la variabilité de l'efficacité (pénétration de la lumière) de cette méthode. Le mécanisme de mort demeure mal compris et la destruction des cellules semble faire intervenir plusieurs voies de signalisation. En effet, la réponse cellulaire (inflammation, apoptose, nécrose) est variable selon la molécule photosensibilisante utilisée et sa dose[113,526]. Elle entraîne l'apoptose des cellules des tissus ayant absorbé le phototsensibilisant (PS)[527], le plus souvent via la voie mitochondriale (« voie intrinsèque ») et une activation des caspases[528,529]. Cette signalisation a été décrite pour les kératinocytes, les cellules cancéreuses du colon et les thymocytes, tandis que les études avec les mélanocytes sont encore récemment très limitées[530].

Le laboratoire de Dermatologie du CHRU de Limoges, avec l'aide de l'EA 3842, a essayé de déterminer les conditions de photosensibilisation. Puis les signalisations de survie (autophagie) et de mort cellulaire sur une lignée mélanocytaire murine, par le 5-ALA (acide 5-aminolévulinique) illuminée en lumière rouge ont été abordées.

1. L'autophagie

L'autophagie jour un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en contrôlant la qualité du cytoplasme, en favorisant l'adaptation et la survie des cellules en situation de stress. En activant l'autophagie, la cellule devient capable de digérer tout ou partie de son contenu que cela soit du cytoplasme, des protéines ou des organites[531,532]. Dans certaines circonstances, elle peut toutefois aboutir à un processus de mort.

Le processus d'autophagie se décline en trois grands types pouvant être présents simultanément dans la cellule ou être variablement prévalent selon les conditions environnementales ou le type cellulaire : la microautophagie, l'autophagie induite par les chaperonnes et la macroautophagie (Fig-87)[533].

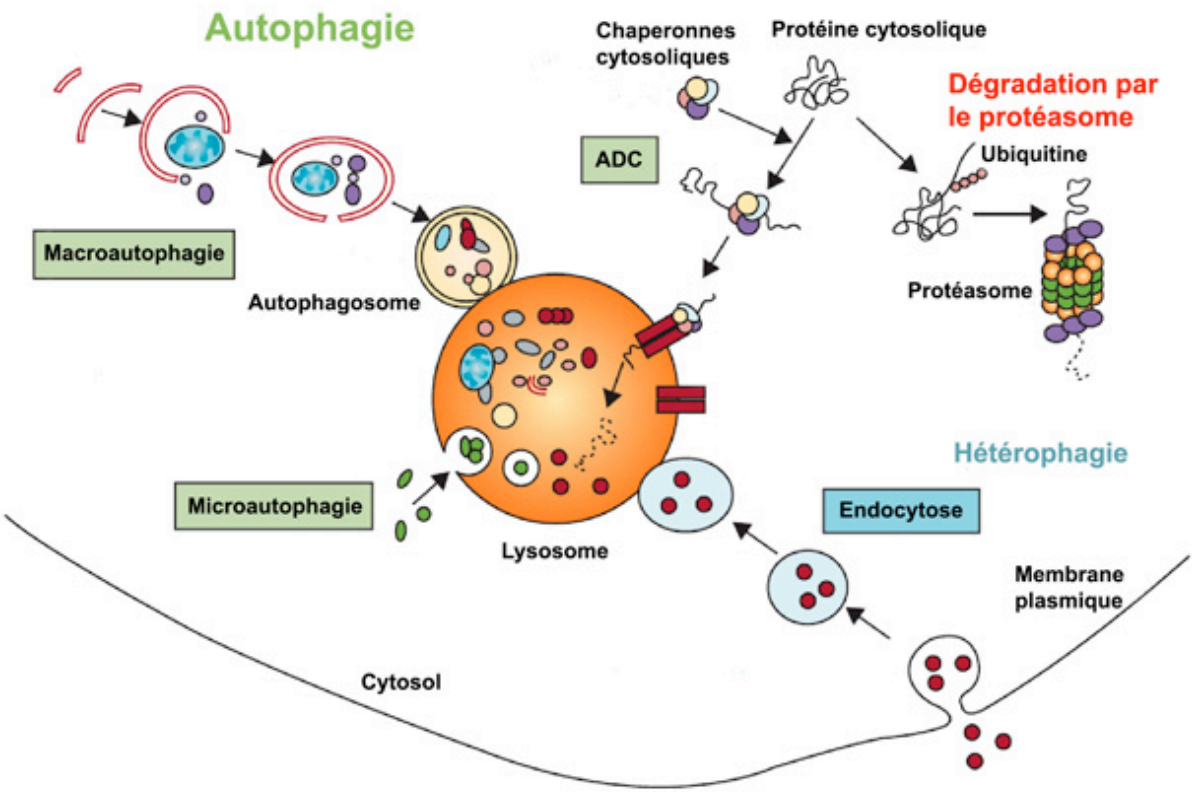


Figure 87- Les différents types d'autophagie (modifié à partir de www.oncoendo.com)

La microautophagie correspond à la séquestration de matériel cytosolique par invagination de la membrane lysosomale sans formation de vésicules intermédiaires et n'est pas induite par les stimulis de la macroautophagie. L'autophagie médiée par les chaperonnes implique, quant à elle, la translocation de substrats dénaturés contenant un motif pentapeptidique (KFERQ (Lys-Phe-Glu-Arg-Gln) essentielle au ciblage de la membrane lysosomale et reconnu par les Heat Shock Protein de 73kDa (hsc 73).

La macroautophagie demeure la voie majeure de recyclage des composants cytoplasmiques par la voie lysosomale. Il s'agit d'un processus cellulaire de survie lors de période de stress, comme le jeûne, l'hypoxie, l'absence de facteurs de croissance.

L'autophagie peut aboutir à un mécanisme qui peut présenter différentes formes de mort depuis l'apoptose à une forme particulière de nécrose.

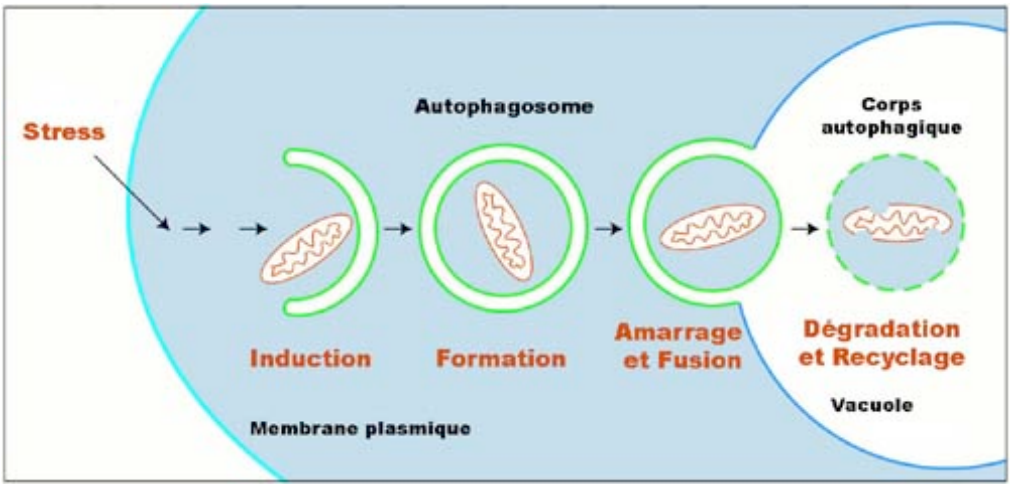


Figure 88 - Processus d'autophagie [534]

La formation d'un autophagosome dans le cytoplasme est l'étape initiale du processus d'autophagie sous le contrôle des gènes ATG (AuTophaGy-related genes)[531] (Fig-88). La première étape est la formation d'une structure multimembranaire, le phagophore, qui en s'allongeant va aboutir à la création d'une vacuole à double membrane, l'autophagosome, capable de séquestrer du matériel cytoplasmique. La vacuole va par la suite fusionner avec le lysosome et son contenu va être dégradé par les enzymes lysosomales.

Les gènes ATG codent pour les protéines intervenant dans le processus d'autophagie et sont classés en 3 sous groupes : le complexe ATG1 kinase et ses régulateurs (ATG13, ATG17, ATG29 et ATG31), le complexe phosphatidyl inositol 3-phosphate kinase (Pl3K) de classe III et les systèmes ATG 12 et ATG 8.

La protéine TOR est un régulateur majeur de la signalisation nutritive et est impliquée dans l'autophagie. Des périodes de privation nutritionnelle peuvent déclencher une autophagie en inhibant la protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin).

Lorsque mTOR est inactivée par une privation nutritive, l'ATG13 est déphosphorylée. Le complexe ATG1 et ATG13 est alors possible et augmente l'activité kinase de l'ATG1 favorisant le recrutement d'autres ATG nécessaires à la formation de l'autophagosome.

Parmi les gènes ATG, Beclin-1 (ATG6/Vps30) est le mieux connu. La formation de l'autophagosome requiert la production de phosphatidyl inositol 3-phosphate kinase (Pl3K) de classe III associée à la protéine Beclin-1 entraînant le recrutement du premier système de conjugaison (Atg12-Atg5). L'ATG8 (LC3) est conjugué à la phosphatidyléthanolamine (PE), composant majeur de diverses membranes biologiques sous contrôle de l'ATG7 et l'ATG3.

Certaines voies de signalisation peuvent jouer un rôle dans la régulation de l'autophagie : la protéine p53, les protéines à domaine BH3, la protéine p27, le TNFα, le céramide, les ERO, le calcium et les dérivés de l'inositol triphosphate.

L'autophagie peut être un frein à l'apoptose pendant des carences nutritionnelles[535,536]. Ce rôle anti-apoptotique est possible grâce à la protéine p27, inhibant le cycle cellulaire. Elle intervient dans la modulation de l'immunité innée et l'immunité adaptative [537,538].

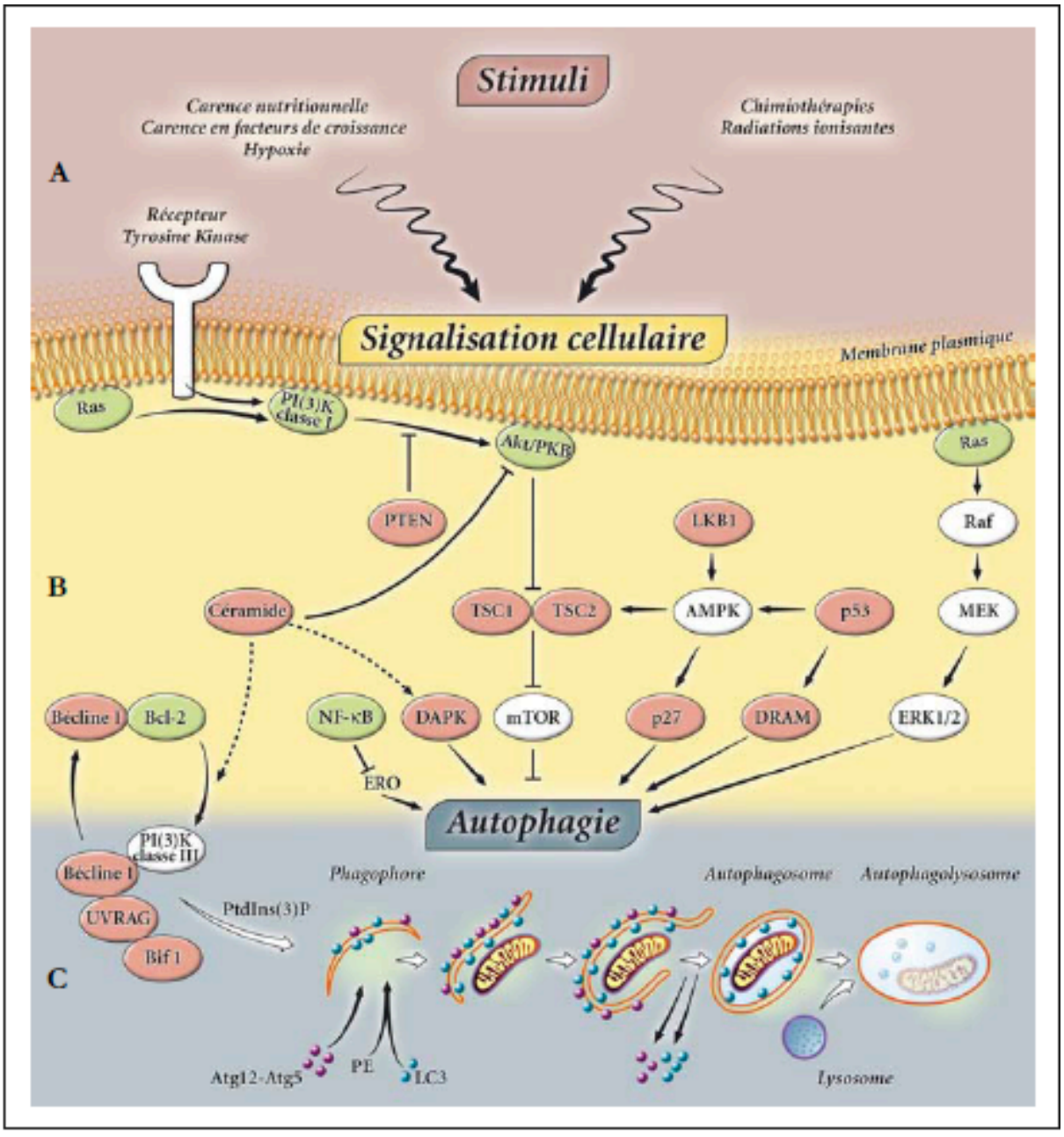


Figure 89 - Régulation de l'autophagie par des suppresseurs de tumeurs et des oncogènes

2. Autophagie et cancer

L'autophagie est un mécanisme vacuolaire de dégradation de matériel intracellulaire. Elle représente une voie majeure du catabolisme lysosomal jouant un rôle dans le contrôle de la longévité et dans des processus pathologiques comme le cancer. Dans ce domaine, le rôle de l'autophagie dans le cancer a été suspecté dès les années 70 en notant que les cellules malignes avaient une capacité d'autophagie plus faible que les cellules normales[540,541]. L'autophagie est impliquée dans la prévention des dommages induits à l'ADN et joue un rôle protecteur vis-à-vis du génome en éliminant les composants génotoxiques de la cellule comme les ERO, les organites endommagés, les protéines et les lipides oxydés[542] (Fig-89). Son rôle supresseur de tumeur pourrait être lié à son effet sur la prolifération cellulaire[540]. La réexpression du gène Beclin-1 dans les cellules tumorales ralentit leur prolifération[543].
L'autophagie serait à l'origine d'un processus anti-inflammatoire et permettrait en inhibant la nécrose, la progression tumorale dans les phases précoces de la tumorogénèse.
A l'inverse quand la tumeur est plus importante, l'autophagie pourrait être une composante de la progression tumorale lorsque les cellules tumorales situées au centre d'une large tumeur sont carencées et hypoxiques et deviendraient capables de déclencher un processus autophagique pour survivre[544].
Le processus d'autophagie est par conséquent un phénomène complexe car il peut conduire à la fois à la survie ou à la mort cellulaire[545]. Les 2 processus sont étroitement liés, puisque l'autophagie peut être indépendante de l'apoptose, l'inhiber ou être nécessaire à son induction. Le lien moléculaire des deux phénomènes serait les protéines Beclin-1 et Bcl-2 ou BclxL[546,547]. En effet, dans des conditions de survie Bcl-2 (BclxL) forme un complexe avec Beclin-1, inhibant ainsi son activité. L'accroissement de l'expression de ce dernier et la diminution des taux de Bcl-2 (ou BclxL) lève cette inhibition et favorise la signalisation autophagique[548].

Le rôle anti-tumoral de l'autophagie est suggéré par son implication dans la réduction de l'instabilité chromosomique, de la prolifération et de l'inflammation des cellules tumorales[540]. A contrario, l'autophagie peut être un mécanisme pro-tumoral en permettant la survie des cellules tumorales exposées à des variations de leur environnement (traitement anti-cancéreux, par exemple).

3. L'autophagie et le mélanome

Les mélanomes au stade métastatique ont un pronostic redoutable, puisque le taux de survie à 5 ans ne dépasse pas 14%. La moyenne de survie de patients métastatiques inopérables est de moins de 10 mois[549]. De nombreuses études ont révélé des mécanismes complexes : augmentation de l'expression de pompe d'efflux, d'enzyme de détoxification et l'inefficacité des programmes de mort apoptotique[550]. Une partie de ces échecs thérapeutiques pourrait être liée au développement d'une résistance aux chimiothérapies et à l'immunothérapie[551,552]. D'autres équipes ont suggéré le rôle de l'activation importante de la voie de prolifération (voies des MAP kinases)[553].

Certaines chimiothérapies comme le cisplatine agissent en induisant l'apoptose[554]. Le temozolomide, molécule aussi employée dans le traitement des métastases cérébrales de mélanome, est capable d'induire une mort cellulaire de type II, autophagique dans les gliomes malins[555].

L'une des explications de la résistance des mélanomes à l'apoptose pourrait être le déclenchement d'un processus d'autophagie[556]. Les cellules de mélanomes sont capables par un processus d'autophagie de synthétiser de l'ATP lorsqu'elles sont privées de nutriments. Cela suggère que des molécules capables d'inhiber l'autophagie pourraient représenter une perspective de traitement des mélanomes métastatiques[557].

Des avancées scientifiques, ces dernières années, ont permis de mieux comprendre les mécanismes moléculaires et génétiques aboutissant à la formation des mélanomes en particulier de nouvelles mutations (NRAS, BRAF) impliquées dans des voies de signalisation[558]. Tormo *et al* décrivaient l'induction d'une autodigestion (autophagie) des mélanocytes tumoraux en culture et *in vivo* par l'administration de l'acide polyinosine-polycytidylique (pIC) couplé au polyethylèneimine (PEI) (Fig-90)[559]. Le gène MDA-5 (Melanoma-Differentiation-Associated gene 5) jouerait un rôle au cours de ce processus d'autophagie et de mort cellulaire provoqués par le pIC/PEI. Ce gène est impliqué dans la réponse immune innée contrôlée par l'interféron[560].

L'autophagie intervient dans la régulation de l'expression des antigènes du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de type I à la surface des cellules et est influencée par l'interferon gamma[561].

Le complexe pIC/PEI est capable d'activer MDA-5 et promouvoir la mort cellulaire[559] (Fig-90).

Au cours de l'autophagie, l'élaboration de l'autophagosome débute lorsque le réticulum endoplasmique (RE) subit un stress (hypoxie, carence nutritionnelle…)[562]. Le rôle du RE des phases d'envahissement des mélanomes a été établi et pourrait expliquer les résistances observées en clinique au traitement[563].

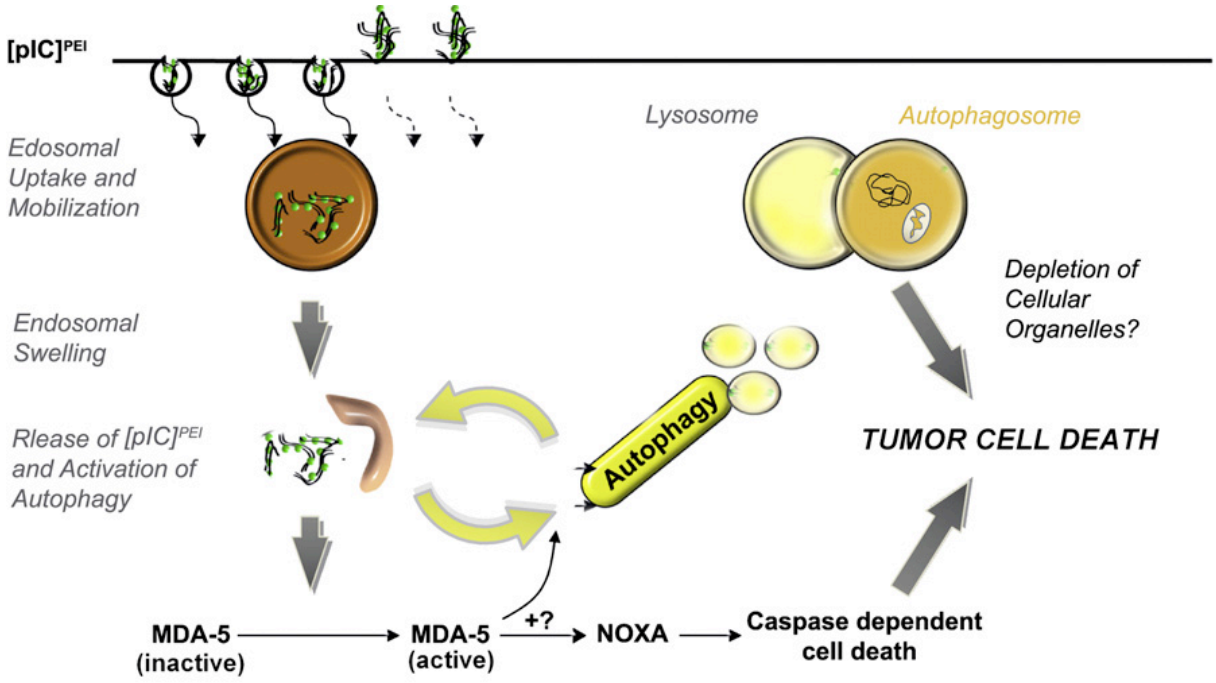


Figure 90 - Mécanismes d'action du acide PolyInosine-polyCytidylique pIC au cours du mélanome [559,564]

L'existence d'autophagie au cours des mélanomes est connue depuis plusieurs années et évoquée par la découverte d'autophagosome contenant les mélanosomes[565]. Ce rôle pourrait être à l'origine de la survie des cellules mélaniques malignes et la progression métastatique. Les molécules anti-autophagiques pourraient être utilisées pour le traitement des mélanomes métastatiques.

4. L'autophagie en Photothérapie dynamique

L'autophagie a été identifiée comme un type de mort cellulaire induite après un traitement par PTD, probablement lorsque les phénomènes d'apoptose sont inexistants ou inefficaces[566,567]. Les protéines antiapoptotiques de la famille Bcl-2, principalement situées dans le RE et la mitochondrie sont sensibles au photosensibilisant utilisé en PTD[568]. La destruction de ces protéines aboutit à l'induction de la nécrose ou de l'apoptose[546,569]. En effet, l'inhibition d'effecteurs apoptotiques (Bax, Bak) est capable d'initier une autophagie[566,570].

Lorsque la cible du PS en PTD est la mitochondrie, la dose de PS ou l'intensité lumineuse oriente les cellules soit vers l'autophagie (doses faibles) ou soit vers la mitophagie avec l'absence d'expression de certains effecteurs (p53…) et à l'origine d'une mort « intermédiaire entre la nécrose et l'apoptose. Après un traitement par PTD, il se produit habituellement une signalisation apoptotique rapide passant par la voie mitochondriale. Ce processus est enclenché lorsque les intensités lumineuses sont modérées et lorsqu'elles sont élevées, il se produit de la nécrose [477]. Récemment, l'autophagie a été décrite comme survenant après une PTD avec un PS ciblant la mitochondrie[56]. Sasnauskiene *et al* montraient que des cellules humaines de carcinome épidermoïde ayant subi une PTD avec de la m-THPC en lumière rouge présentaient des caractéristiques d'autophagie[571].

D'autres études sont nécessaires pour comprendre les mécanismes orientant la cellule cancéreuse dans des voies de signalisation de survie par autophagie ou de mort autophagique apoptotique ou nécrotique.

B- Matériel et Méthodes

1. Culture cellulaire et suivi de la croissance

Deux lignées cellulaires étaient utilisées : les lignées de mélanocytes tumoraux murins B16F10 et les B16G4F (gracieusement fournie par le Pr. A. Oulmouden, UMR INRA 1061, Université de Limoges). Les B16G4F étaient mutées pour le récepteur MC1R (récepteur de la mélanocortine). Par conséquent, elles avaient perdu leur capacité à synthétiser la mélanine[572]. Les B16F10 ont un nombre limité de passage synthétisant de la mélanine.

Le milieu de culture utilisé était du milieu DMEM, contenant du Glutamax-1 (InVitrogen), enrichi avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, InVitrogen) et additionné de pénicilline-streptomycine (1%).

Pour évaluer la croissance des cellules B16F10, elles étaient ensemencées dans une série de 5 flasques T25 (25 cm^2) à 150 000 cellules par flasque au jour 0. Toutes les 24 h, pendant une semaine, une flasque T25 était trypsinée et les cellules vivantes étaient numérées par un test d'exclusion au bleu-Trypan.

2. Traitement photodynamique

a) Incubation cellulaire du photosensibilisant

Pour chaque analyse, les cellules B16F10 (ou B16G4F) étaient ensemencées 24 h avant le traitement au 5-ALA (5-delta-aminolevulinic acid hydrochloride, Sigma-Aldrich Chimie). La solution de 5-ALA à 30 mM était solubilisée dans du milieu de culture (DMEM complet). Toutes les manipulations effectuées étaient réalisées dans l'obscurité en conditions stériles. Les cellules étaient traitées à différentes concentrations de 5-ALA (0,5, 1, 3 et 5 mM) et incubées dans l'obscurité pendant 2 h avant l'illumination.

b) Illumination en lumière rouge

Les cellules ensemencées en plaque de 96 puits à la densité de 10.000 cellules/puits étaient illuminées en lumière rouge (630 nm). La source lumineuse utilisée était la lampe Aktilite®, modèle CL128, Galderma (Fig-91), couvrant une surface de 80 × 180 mm et utilisant la lumière LED (diodes électroluminescentes). La dose utilisée était de 37 J/cm^2 ce qui correspondait à 8 min 53 secondes de temps d'illumination.

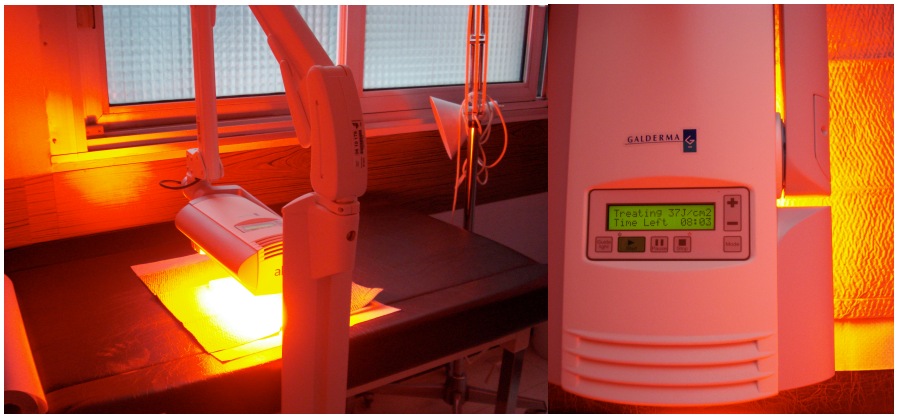


Figure 91 - Lampe rouge Aktilite®, modèle CL128, Galderma

Pour effectuer le traitement de photothérapie dynamique, différentes étapes étaient nécessaires (Fig-92). De plus, plusieurs types de cultures « témoins » étaient réalisées : 1) les cellules non traitées au 5-ALA et non illuminées ; 2) les cellules traitées au 5-ALA et non illuminées ; 3) les cellules non traitées au 5-ALA, mais illuminées en lumière rouge. Les cultures témoins étaient réalisées dans les mêmes conditions que les cultures traitées. Chaque condition était réalisée en triplicate.

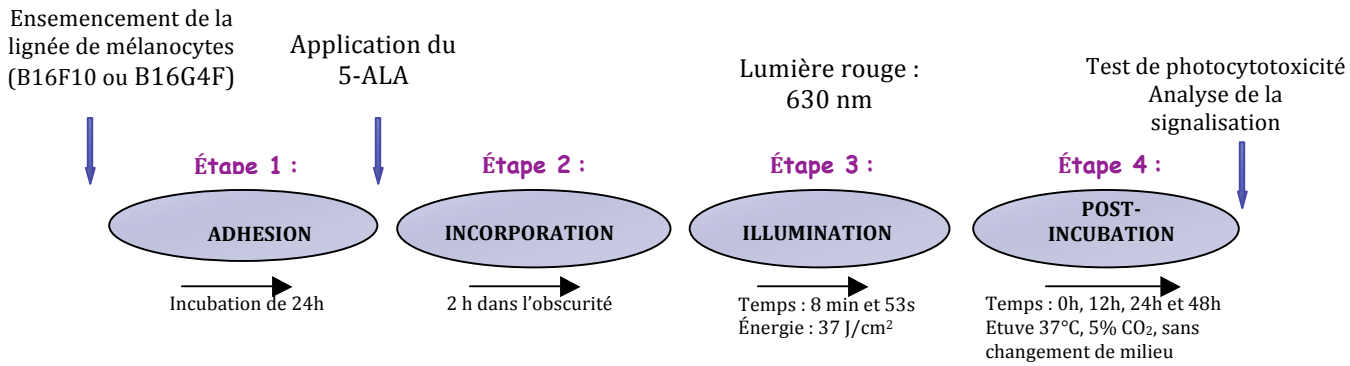


Figure 92 - Résumé des étapes du traitement de photothérapie dynamique appliqué aux cellules, à la mise en place des différents tests et analyses effectuées.

3. Détermination de la photocytotoxicité

La photocytotoxicité de la molécule 5-ALA était évaluée avec le kit « Cell Proliferation Kit II » (Roche). Ce test permet de mesurer l'activité de la succinate deshydrogénase (SD) mitochondriale, enzyme n'étant active que lorsque les mitochondries sont fonctionnelles, donc dans les cellules intactes. Cette enzyme clive le XTT (sel de tétrazolium : 2,3-bis [2-methoxy-4 nitro-5-sulfophenyl]-2H-tetrazolium-5-carboxanilide) libérant ainsi des cristaux de formazan orange, solubles dans le milieu de culture. Ainsi, la quantité de formazan formée est proportionnelle, la plupart du temps, au nombre de cellules vivantes dans le milieu de culture. Ce test permet de comparer la croissance des cellules témoins à celle des cellules traitées.
Le milieu de culture était remplacé pour chaque puits par 50 µL de XTT (0,3 mg/ml) solubilisé dans du milieu DMEM, sans SVF, ni antibiotique ni rouge de phénol (100 µl). Après 24 h d'incubation, l'intensité de coloration était mesurée par spectrophotométrie à 490 nm, par rapport à une longueur d'onde de référence de 630 nm. L'activité deshydrogénase était mesurée selon des temps d'incubation variables après l'illumination (0 h, 12 h, 24 h, 48 h).

4. Mesure du potentiel membranaire mitochondrial

Le potentiel membranaire mitochondrial ou $\Delta\Psi$mt, est estimé avec le JC-1 (fluorochrome). En effet, lorsqu'une cellule possède un potentiel membranaire mitochondrial intact, le JC-1 est incorporé spécifiquement dans les mitochondries. Il se polymérise, forme des agrégats et émet une fluorescence orange à 575 nm. Lors d'une chute de ce potentiel, le JC-1 reste sous sa forme monomérique, son incorporation devient non spécifique, et il émet une fluorescence verte à 530 nm. Cette analyse est couplée à celle de l'intégrité membranaire estimée avec le TOPRO-3. Ce dernier ne pénètre dans les cellules que lorsque l'intégrité de la membrane plasmique est altérée ; dans ce cas, il se lie aux acides nucléiques[573].

Les cellules étaient cultivées dans des plaques de 6 puits (surface de 12 cm^2). Elles étaient ensemencées à 2.10^5 cellules/puits. Après 24 h, elles étaient prétraitées ou non, avec le 5-ALA à concentration variable de 3 et 5 mM pendant 2 h. Elles étaient illuminées en lumière rouge. Les mêmes témoins que précédemment (utilisés pour le XTT) étaient également étudiés. Les cellules étaient ensuite décollées (trypsine), centrifugées et ajustées à 1.10^6 cellules/ml.

L'incorporation du JC-1 à 1 µM était réalisée pendant 30 minutes à 37°C. Le TOPRO-3 était ajouté extemporanément à une concentration de 1 µM.

Les cellules étaient analysées avec un analyseur-trieur FACS Vantage (Becton-Dickinson, USA) possédant un laser Argon et Hélium/Néon. Le JC-1 était excité avec le laser Argon à 488 nm et sa fluorescence verte était collectée en FL1 (filtre passe-bande 530 +/- 15 nm), tandis que sa fluorescence orange était collectée en FL2 (filtre passe-bande 575 +/- 13 nm). Le TOPRO-3 était excité avec le laser Hélium/Néon à 633 nm, et son émission était récupérée en FL4 (650 nm). Un minimum de 10000 cellules (après élimination des débris et agrégats) était analysé. Les données cytométriques étaient analysées avec le logiciel WinMDI 2.8 (développé par le Dr. J. Trotter, Institut Scripps, La Jolla, CA).

Afin de mesurer le potentiel mitochondrial membranaire et l'intégrité membranaire (JC-1, TOPRO-3), il était nécessaire de vérifier que le 5-ALA, mais également son métabolite intracellulaire résultant, la protoporphyrine IX, n'émettaient pas de fluorescence pouvant entrer en « compétition » avec les longueurs d'ondes analysées pour le JC-1 et le TOPRO-3. Pour cela, les cellules étaient incubées pendant 2 h avec trois concentrations de 5-ALA (0,5, 1 et 3 mM) et étaient illuminées en lumière rouge. Les fluorescence verte, orange, rouge des cellules témoins sans le 5-ALA, illuminées et non illuminées, ainsi que des cellules incubées (pendant 2 h), mais non traitées étaient également analysées par cytométrie en flux.

5. Etude de la conformation de la chromatine des cellules B16F10

Le Hoechst 33342 est un dérivé de benzimidazole ; ce fluorochrome a une haute affinité pour l'ADN en interagissant préférentiellement avec les bases A-T par des liaisons électrostatiques. Il émet une fluorescence bleue lors de l'exposition aux UV. L'observation de la fluorescence émise par les cellules colorées par cette molécule, permet d'apprécier les changements de condensation de la chromatine.

Pour cette analyse, des cellules B16F10 étaient ensemencées à 100 000 cellules sur lamelle de verre dans des plaques 24 puits. Après 24 h d'incubation, les cellules B16F10 étaient traitées au 5-ALA (3 mM) et illuminées en lumière rouge. Des cellules, sans traitement ni illumination, servant de témoins, étaient également analysées. Dans ce cas, seul le temps post-illumination de 24 h était effectué. Le milieu de chaque culture était ensuite prélevé, et deux aliquots (A1 et A2) étaient préparés à partir de chaque échantillon. Dans les échantillons A1, du PBS seul était additionné (cellules vivantes), alors que les échantillons A2 étaient fixés avec du PFA à 4% dans du PBS, pendant 10 min à 4°C. Puis, les cellules fixées et non fixées

(lavées avec du PBS) étaient colorées au Hoechst 33342 (10 µg/mL) pendant 10 min à température ambiante à l'obscurité, et analysées en microscope à épifluorescence et avec un objectif 40X à immersion.

6. Analyse de l'expression de p53 et de Beclin-1 par Western blot

a) Extraction protéique

L'expression de la protéine p53 et de Beclin-1 était recherchée par western blot (WB) en référence à celle de l'actine comme protéine standard. L'extraction protéique était réalisée en deux étapes. Les culots cellulaires (contenant environ 5.10^6 cellules) étaient tout d'abord soumis à une lyse chimique. Ils étaient repris et homogénéisés dans 200 µL de tampon de lyse (50 mM Pipes/HCL (pH 6,5) ; 2 mM EDTA; 0,1 % Chaps ; 1 mM PMSF ; 5 mM DTT) (Cell Signaling). Les mélanges étaient alors laissés 45 min dans la glace. Puis, une lyse mécanique à l'aide d'un sonificateur (40 Hz, 1 min, intervalle de pulsation 2 s) était réalisée. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 14000g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines était récupéré et celles-ci étaient dosées par la méthode Bradford. Pour cela, les échantillons protéiques étaient dilués au $1/200^e$ et le réactif de Bradford (Sigma Aldrich) était mélangé, volume/volume, aux échantillons. La concentration protéique était déterminée par mesure de la densité optique à l'aide d'un spectrophotomètre (MRX II, Dynaex technologies), à la longueur d'onde de 630 nm, en référence à une gamme étalon d'albumine sérique bovine BSA (Sigma) de concentration connue.

b) Séparation des protéines par électrophorèse

La séparation des proéines était effectuée par électrophorèse dans des conditions dénaturantes. Un gel de séparation de 12% (Tab-6) était préparé pour une électrophorèse SDS-PAGE (Appareil Biorad).

Une fois le gel coulé, de l'isobutanol était ajouté afin d'aplanir et éviter que le gel ne se déshydrate. Une fois polymérisé, le gel de concentration 5% (Tab-7) était coulé. Enfin, le gel était placé dans la cuve à électrophorèse, remplie de tampon de migration (Tab-7).
Les protéines étaient diluées au ½ dans du tampon de charge (Tab-7), dénaturées à 95°C pendant 5 min, puis déposées 1 min sur glace avant le dépôt de 30 µg par puits. Une piste était réservée pour le marqueur de taille (PageRuler ™ Plus Prestained Protein Ladder, Fermentas Life Sciences).

c) Transfert et révélation

Après migration à 200 V pendant 1 h à 4°C, le transfert sur membrane PVDF (Polyvinylidene fluoride, Immobilon-P) était effectué à l'aide d'un appareil de transfert à 15 V et 250 mA pendant 2 h (Trans-blot SD Semi-Dry Transfer Cell, Biorad, tampon de transfert, Tab-7).
Les membranes étaient ensuite saturées pendant 1 h sous agitation à température ambiante dans une solution TBS, Tween-20 0,1%, lait écrémé 5%. L'immunomarquage était réalisé par incubation de l'anticorps primaire (anti-p53 ou anti-actine, Tab-8) pendant 2 h sous agitation à température ambiante.

Après 3 lavages avec du tampon TBS-Tween-20 à 0,1%, la membrane était incubée avec l'anticorps secondaire, couplé à la peroxydase, dilué au 1/2000^{e}, pendant 1 h sous agitation à température ambiante. L'anticorps non fixé était éliminé par quatre lavages successifs au TBS-Tween-20 0,1 %. Les membranes étaient incubées 1 min avec la solution de luminol (Santa Cruz Biotechnology) dans le but de visualiser la réaction antigène-anticorps. Le principe de la détection repose sur l'oxydation de l'H_2O_2 par la peroxydase, libérant de l'O_2 qui oxyde le luminol. Il se forme un composé intermédiaire instable, qui émet de la lumière en revenant à une forme plus stable. Le signal lumineux était visualisé grâce à un analyseur d'image (G : Box, Ozyme).

7. Etude de la présence de la Glycoprotéine-P

La résistance des cellules B16F10 au traitement par le 5-ALA nous a conduit à rechercher l'expression membranaire d'une protéine pouvant effluer la molécule : la Glycoprotéine-P (P-gp), produit du gène *MDR-1*. Cette protéine de 170 kDa fonctionne comme une pompe d'efflux pour un grand nombre de substrats, et elle a été retrouvée dans de nombreux cancers dont les mélanomes.

Elle était recherchée sur les cellules B16F10 par marquage en immunofluorescence indirecte (IFI) par microscopie confocale. Un contrôle isotypique avec un anticorps « irrelevant » était réalisé en parallèle. Chaque tube contenait une suspension de 500.000 cellules. Ces dernières étaient fixées pendant 15 min à 4°C dans une solution de PFA-PBS (4%), puis lavées deux fois dans une solution de PBS 1x, BSA 1,5%. 20 µL d'anticorps monoclonal de souris anti-P-gp (Clone UIC2, Immunotech), dirigé contre l'épitope extra-cellulaire de la glycoprotéine-P, était ajouté au tube « test » et 20 µL d'IgG2a isotypique est ajouté au tube contrôle. Les cellules étaient ensuite incubées 45 min à 4°C à l'obscurité. Après lavage (PBS-BSA 1,5%), l'anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488 est incubé en présence de TOPRO-3 pendant 45 min dans l'obscurité. Trois lavages successifs étaient réalisés et 10 µL de chaque essai était déposé entre lame et lamelle en présence de liquide de montage (glycérol). L'analyse était effectuée par microscopie confocale (ZEISS LSM 510 META).

C- Résultats

1. Caractéristiques de la croissance et morphologiques de la lignée B16F10

Les cellules B16F10 étaient ensemencées à une concentration de 150000 cellules par flasque et comptées tous les jours pendant quatre jours afin d'obtenir une courbe de croissance nécessaire pour la suite des expériences (Fig-93).

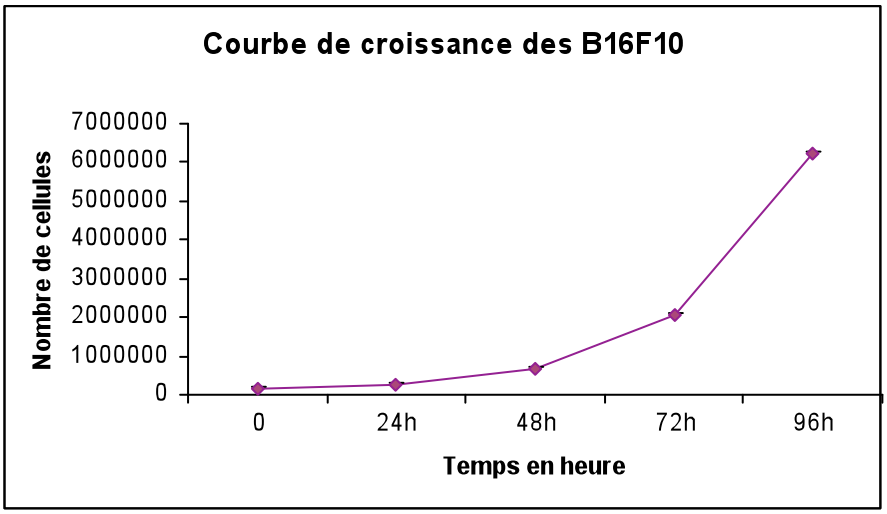
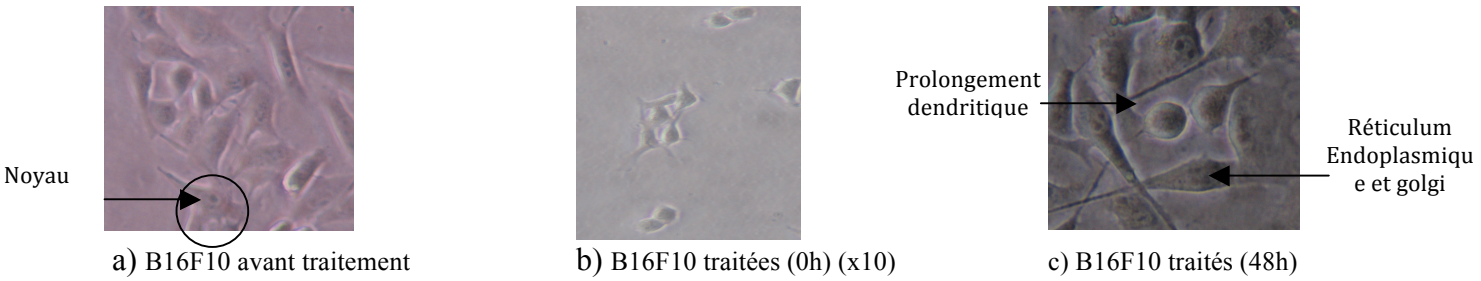


Figure 93- Courbe de croissance des cellules B16F10 en flasque

Les cellules sont très rapidement en phase exponentielle. Toutefois aucune phase de ralentissement n'était observée témoignant du pouvoir prolifératif de la lignée. Un facteur de croissance moyen de 2,61 était obtenu.

2. Induction de la cytotoxicité et étude de l'effet potentiel du 5-ALA, combiné à l'illumination en lumière rouge, sur la lignée B16F10

Afin de caractériser le modèle cellulaire B16F10 dans les conditions d'induction de la cytotoxicité par le 5-ALA combinée à l'illumination en rouge, les cellules étaient photographiées avant le traitement puis, à différents temps, post-illumination. Leur morphologie était observée et étudiée grâce au microscope inversé en lumière blanche (Fig-94).



a) B16F10 avant traitement b) B16F10 traitées (0h) (x10) c) B16F10 traités (48h)

Figure 94 - Observations microscopiques des cellules B16F10 non traitées, et traitées au 5-ALA (3 mM) et illuminées en lumière rouge (x 40).

Les mélanocytes B16F10 observés (Fig-94 a) présentaient un aspect étoilé, avec de longs prolongements. Après l'illumination, au temps 0h (b) et 48h (c), quelques cellules se détachaient du support, devenaient rondes et perdaient leur morphologie initiale suggérant une signalisation de mort pour certaines.

L'effet cytotoxique de l'acide 5-aminolévulinique combiné à l'illumination en lumière rouge, était estimé sur la lignée B16F10 grâce au test XTT (quatre concentrations différentes), afin de déterminer la dose la plus efficace, entraînant une mortalité cellulaire significative. D'autre part, plusieurs temps d'incubation post-illumination étaient réalisés afin de déterminer le temps nécessaire pour provoquer une mortalité des cellules B16F10.
Par ailleurs, plusieurs témoins étaient nécessaires pour chaque temps afin de vérifier que la lumière rouge, seule, et le 5-ALA, seul, n'entraînaient pas une cytotoxicité sur la lignée B16F10.

α. Etude de la photocytotoxicité des conditions « témoins »

Les cellules B16F10 étaient incubées en présence de milieu dans lequel l'acide 5-aminolévulinique était dissout à différentes concentrations (0,5, 1, 3 et 5 mM). Quatre temps post-illumination étaient réalisés (0h, 12h, 24h et 48h).
Les activités deshydrogénases de tous les témoins étaient réalisées dans les mêmes conditions que les cellules traitées (Fig-95).

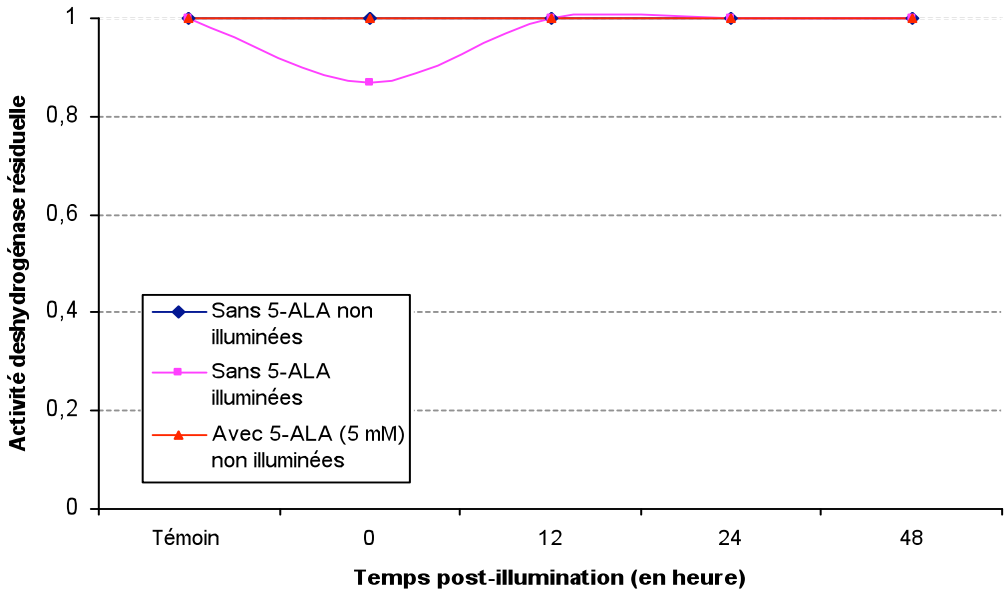


Figure 95 - Etude de la Photocytotoxicité en XTT sur la lignée des mélanocytes B16F10 des conditions témoins : 5-ALA (5 mM) seul et illumination en lumière rouge seule.

Témoins sans ALA ni illumination

Les densités optiques obtenues de l'activité succinate deshydrogénase étaient normalisées à 1 pour les témoins. Ces témoins permettaient d'établir que le 5-ALA (5 mM) seul n'avait aucun effet significatif sur l'activité deshydrogénase des cellules B16F10. Cependant, l'illumination seule, au temps 0 h, entraînait une diminution de l'activité deshydrogénase (13 %). L'illumination semblait freiner transitoirement la croissance cellulaire et entraîner également une légère perte de l'activité deshydrogénase. De plus, il était nécessaire de vérifier la variation de température lors de l'illumination. Celle-ci passait de 25°C sous la lampe à 27°C après l'illumination. On pouvait supposer que cette augmentation avait peu d'effet sur la viabilité des cellules B16F10.

β Photocytotoxicité du traitement au 5-ALA et de l'illumination

La photocytotoxicité du 5-ALA (0,5, 1, 3 et 5 mM) couplée à l'illumination en lumière rouge était etudiée. Les résultats obtenus pour les concentrations en 5-ALA de 3 et 5 mM étaient représentés (Fig-96). Trois tests XTT indépendants étaient réalisés.

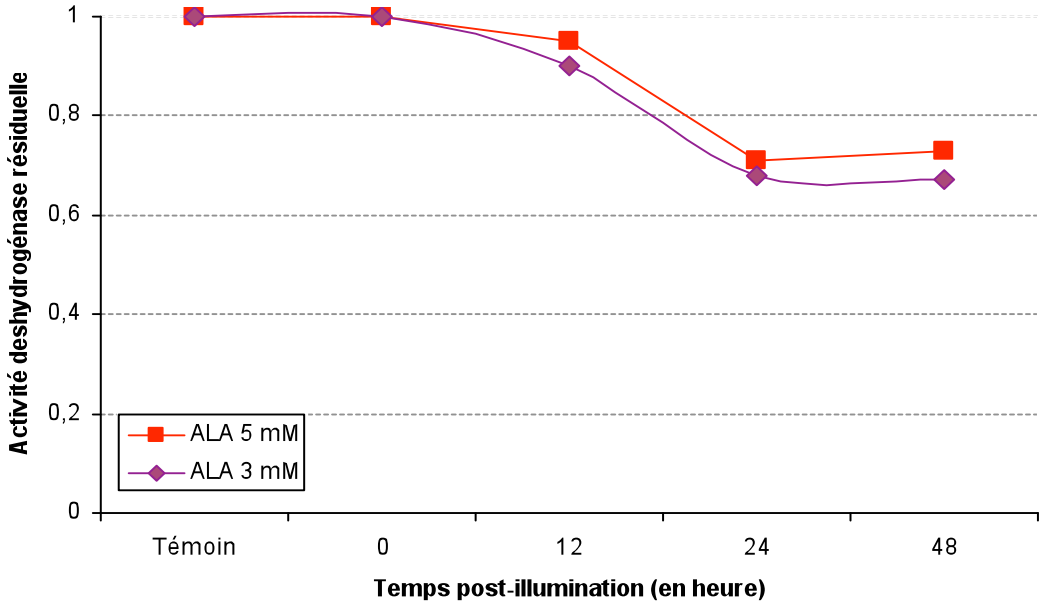


Figure 96 - Etude de la photocytotoxicité en XTT sur la lignée des mélanocytes B16F10 : 5-ALA (3 mM et 5 mM) combiné à l'illumination en lumière rouge.

Témoin : sans ALA ni illumination

Le 5-ALA à 3 mM (avec l'illumination) entraînait une légère photocytotoxicité dès le temps 0 h. On pouvait comparer cette activité avec celle des cellules témoins illuminées (sans 5-ALA). La diminution de l'activité deshydrogénase se poursuivait au temps 24 h et 48 h. Elle était la conséquence de l'effet cytotoxique du 5-ALA (combinée à l'illumination en lumière rouge). En effet, une diminution d'environ 32 % des cellules B16F10 était obtenue à 24 h à une concentration de 3 mM. Une diminution similaire (29 %) était obtenue avec une concentration en 5-ALA de 5 mM. La prolongation de l'incubation à un temps de 48 h après le traitement ne modifiait pas la photocytotoxicité du traitement (33 % pour 3 mM et 27 % pour 5 mM).

Ces résultats nous permettaient de traiter, par la suite, les cellules avec l'acide 5-aminolévulinique à 3 et 5 mM pendant 2 h (temps utilisé pour les traitements en clinique), suivi d'une incubation allant jusqu'à 48 h.

3. Mesure du potentiel membranaire mitochondrial

Les résultats de photocytotoxicité permettaient de réaliser des analyses pour déterminer le type de mort cellulaire (apoptose ou nécrose), induit par la photothérapie dynamique. Pour cela, la fluorescence d'une molécule : le JC-1, dont l'incorporation est proportionnelle au potentiel membranaire mitochondrial était choisi. La chute de celui-ci est un évènement précoce de la signalisation apoptotique. L'analyse de $\Delta\Psi mt$ était associée à celle de l'intégrité de la membrane plasmique (avec du TOPRO-3). La rupture précoce était une caractéristique des cellules en nécrose.

Dans un premier temps, nous avions vérifié que le 5-ALA, mais aussi la protoporphyrine IX (qui est le produit actif dans les cellules) n'émettaient pas une fluorescence pouvant se superposer à celle obtenue avec le JC-1 et/ou le TOPRO-3. Les analyses de fluorescence étaient effectuées pour les longueurs d'onde de 530 nm (vert), de 575 nm (orange) et de 650 nm (rouge). Les histogrammes obtenus ne montraient aucune fluorescence significative émise par le 5-ALA et la protoporphyrine dans les longueurs d'onde testées. Les analyses de cytométrie en flux pouvaient donc être poursuivies pour les cellules traitées et témoins. Deux concentrations de 5-ALA (3 mM et 5 mM) étaient utilisées pour cette analyse pour chaque temps post-illumination (0 h, 12 h, 24 h et 48 h). Les mêmes témoins que pour le XTT étaient réalisés.

Le cytogramme permettait de distinguer 3 zones représentant trois états cellulaires distincts (Fig-98). En effet, la population R1 représentait les cellules vivantes ayant leurs membranes intactes (fluorescence TOPRO-3 faible) et un potentiel membranaire mitochondrial « normal » (fluorescence JC-1 orange élevée). La zone R2 représentait les cellules en apoptose avec une membrane intacte (fluorescence TOPRO-3 basse) et un potentiel membranaire mitochondrial faible (fluorescence JC-1 orange basse). Une troisième population cellulaire, R3, correspondait aux cellules mortes (nécrose), ou en apoptose tardive et correspondait à des cellules présentant une altération des membranes plasmiques (fluorescence TOPRO-3 élevée) et une chute du potentiel membranaire mitochondrial (fluorescence JC-1 orange faible).

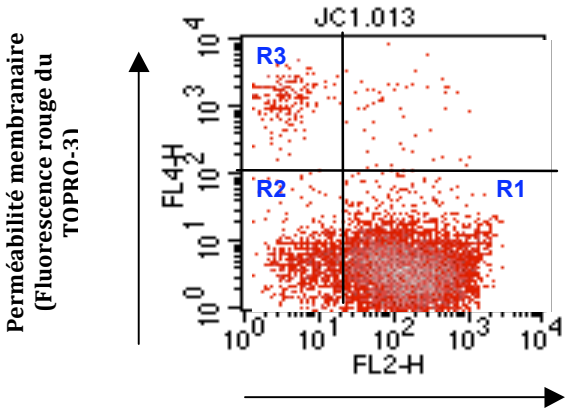


Figure 97 - Cytogramme du double marquage JC-1/TOPRO-3, représentant les trois populations cellulaires obtenues, sur les cellules B16F10 non traitées. Les moyennes de quatre tests indépendants étaient représentées, les barres d'erreurs ne pouvant figurer dans la représentation choisie

Quelle que soit la dose et le temps analysé, le 5-ALA semblait avoir peu ou pas d'effet sur la lignée B16F10 (Fig-98). La dose de 3 mM ne semblait pas affecter de manière significative le pourcentage de cellules intactes, en apoptose ou en nécrose (Fig-97a) quelles ques soient les conditions. Pour la dose de 5 mM (Fig-97b), on pouvait observer un effet qui diminuait au cours du temps. Au temps 0 h (post-illumination), on observait une augmentation du nombre de cellules ayant un $\Delta\Psi$mt faible (31 %). Cela coïncidait avec la photocytotoxicité observée au même temps avec l'illumination seule et ne pouvait donc pas être attribué au traitement du 5-ALA, couplé à l'illumination. Pour les autres conditions, le pourcentage de cellules intactes, en apoptose et en nécrose était similaire quelles ques soient les conditions (Fig-96). Le nombre de cellules vivantes aux temps 24 h et 48 h à 5 mM (environ 82 % et environ 87 % respectivement) était quasiment équivalent aux cellules témoins (environ 94 %).

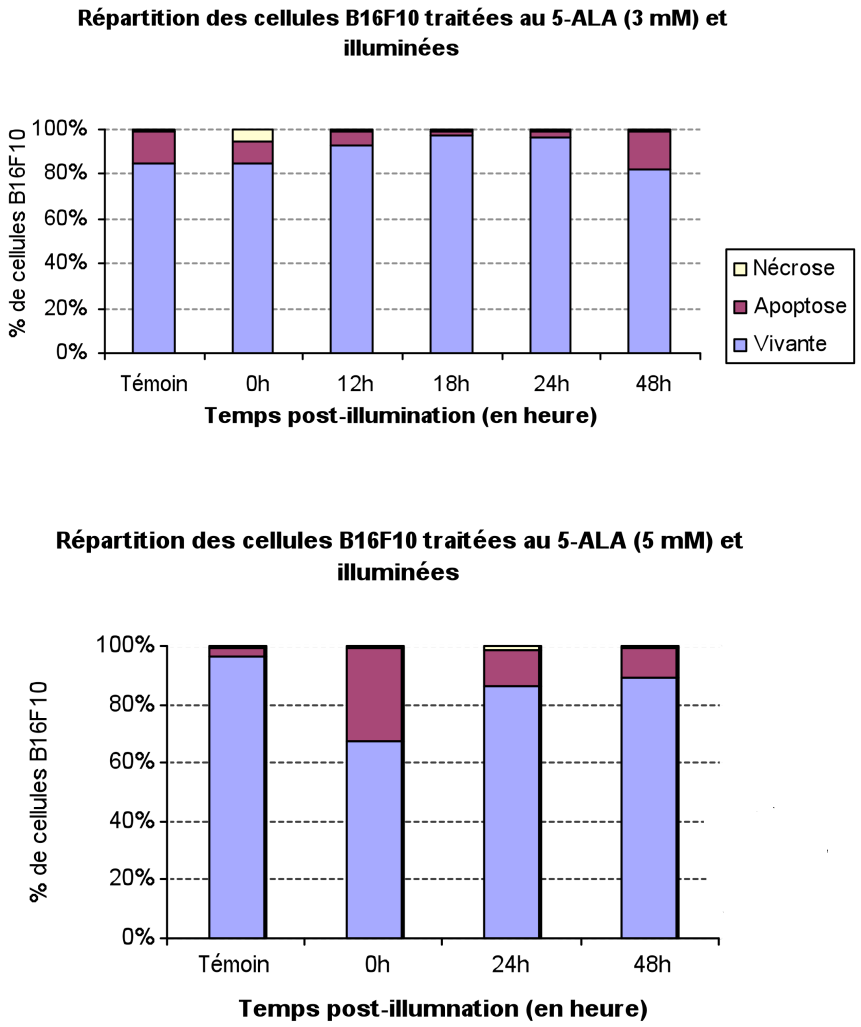
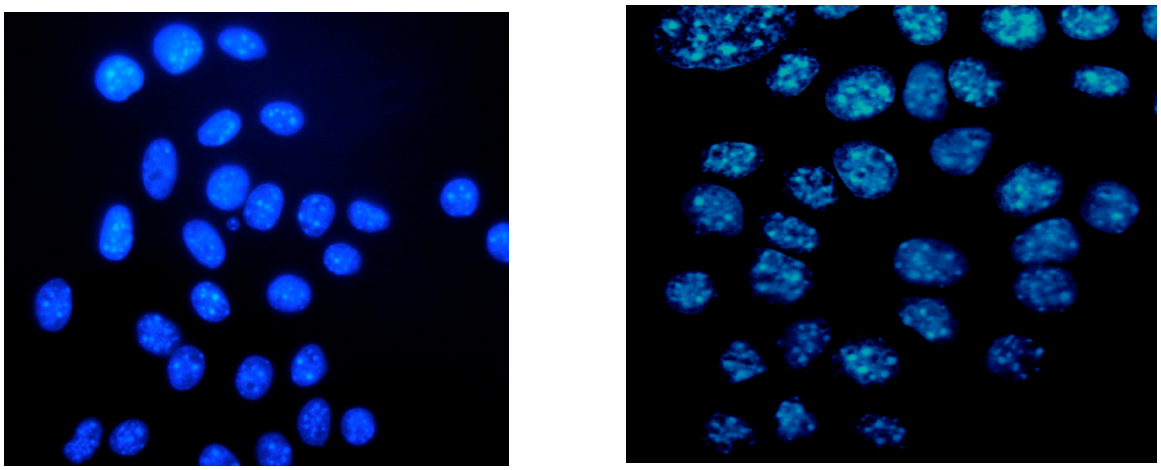


Figure 98 - Répartition des cellules intactes, en apoptose et en nécrose dans des cultures de mélanocytes B16F10 témoins (non traités), traitées au 5-ALA (3 mM (a) et 5 mM (b)) et analysées aux temps post-illumination 0 h, 12 h,18 h, 24 h et 48 h.

4. Observation des noyaux des cellules B16F10

Le marquage au Hoechst 33342 des cellules B16F10 traitées (3 mM) et non traitées, permettait d'observer le matériel nucléaire des cellules. Les résultats (Fig-99) permettaient d'observer la coloration, plus intense, de la chromatine contenue dans le noyau des cellules. Aucun signe de fragmentation de l'ADN n'était observé à 24 h, toutefois, l'état de condensation de la chromatine semblait légèrement différent comme en témoigne les différences de fluorescence observées (Fig-99).



a) Témoins b) Traitées (3 mM)

Figure 99 - Marquage au Hoechst 33342 des cellules B16F10 témoins (a) et traitées (3 mM) à 24h (b).

5. Analyse de l'expression de p53 par Western Blot

L'expression de la protéine *p53* qui est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et dans l'induction de la mort cellulaire (dans certaines voies de signalisation) a été étudiée. Il n'était pas possible de détecter la présence de *p5*3 (Fig-100), pour tous les temps post-illumination, ainsi que pour tous les témoins. Ceci confirmait les analyses précédentes, où aucune mort cellulaire significative n'était détectée suite au traitement par PTD.

Aussi, nous avions essayé de comprendre cette absence d'induction de mort, bien que l'on observait une diminution de 30 % de l'activité deshydrogénase et que certaines cellules avaient un ΔΨmt diminué.

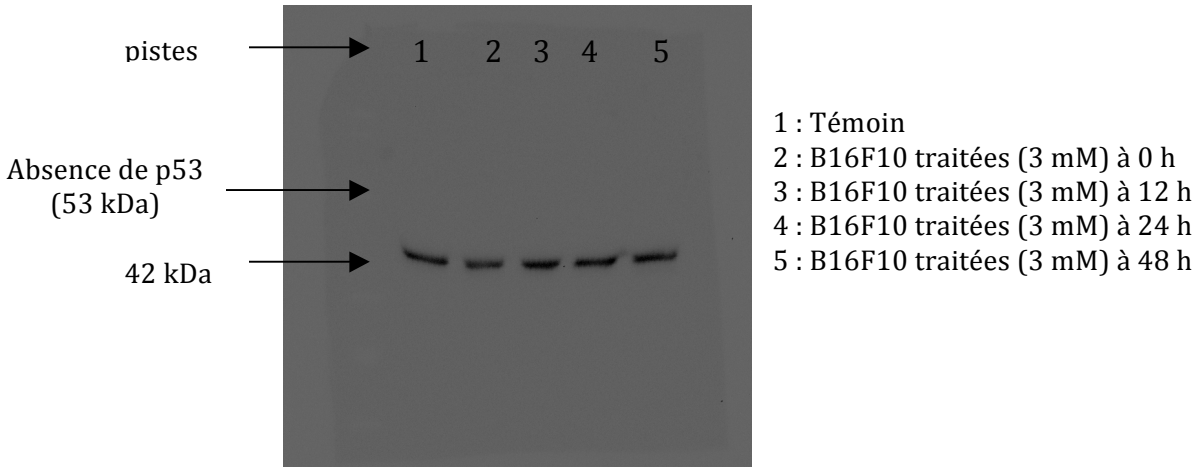


Figure 100 - Western Blot : Détection de la p53 et de l'actine.

6. Facteurs pouvant expliquer l'insensibilité de la lignée B16F10 à la PDT

a) Conditions d'illumination

Lors de l'illumination, les cellules B16F10 étaient peut-être protégées d'une part par le milieu contenu dans les puits (2,5 mL) et d'autre part par le couvercle des plaques (nécessaire afin de rester dans des conditions stériles). En effet, l'épaisseur du milieu, ainsi que le plastique pouvait entraîner une diffraction de la lumière et donc protéger en partie les cellules de l'illumination. Comme précédemment, nous avions effectué les mêmes témoins et essais (post-incubation de 24 h). C'est au moment de l'illumination que nous avions retiré 2 mL de milieu de culture (les cellules sont justes recouvertes de milieu) ou le couvercle. De manière similaire aux autres expériences, après le temps post-incubation de 24 h, nous réalisions une analyse du potentiel membranaire mitochondrial et de l'intégrité membranaire par cytométrie en flux. Quelles ques soient les conditions appliquées (retrait de milieu ou du couvercle), nous n'observions aucune différence significative dans le pourcentage de cellules intactes, en apoptose ou en nécrose.

b) Recherche d'une protéine d'efflux sur la lignée cellulaire B16F10

Les résultats obtenus, lors de la mesure du potentiel mitochondrial ne permettaient pas de mesurer un processus de mort suffisant, pour confirmer l'induction d'une mort apoptotique ou nécrotique lors du traitement en photothérapie dynamique. Aussi, nous avions recherché, sur la lignée cellulaire B16F10, la présence d'une pompe membranaire d'efflux. En effet, la résistance à différentes molécules est un phénomène rencontré dans de nombreuses cellules tumorales, les rendant résistantes à la thérapie anticancéreuse. Un des mécanismes responsables de ces effets est la résistance à l'accumulation de la drogue (dans notre cas le 5-ALA) à l'intérieur de la cellule, qui est dû très souvent à l'activité d'une protéine transmembranaire, la glycoprotéine-P 170 (P-gp), produit du gène *MDR-1*. La glycoprotéine-P est une pompe membranaire ATP-dépendante, avec une large spécificité de substrats. Nous avions cherché à localiser cette protéine, par microscopie confocale, afin de savoir si elle était exprimée sur la membrane plasmique (Fig-101).

a) isotype b) test

Figure 101 - Analyse en immunofluorescence et contraste de phase des cellules B16F10 : recherche de l'expression de la glycoprotéine-P par immunofluorescence indirecte.

La fluorescence apparaîssait faible et aussi bien dans les cellules marquées avec un anticorps « irrelevant » (contrôle isotypique, Fig-101a), et celles marquées avec l'anticorps anti P-gp170 (Fig-101b). Ceci permettait de suggérer que les cellules B16F10 n'exprimaient pas la P-gp170. Elle ne semblait pas être responsable de la cytotoxicité modérée observée avec le test XTT et dans la mesure du potentiel membranaire mitochondrial. Néanmoins, d'autres protéines de la famille ABC (MRP : Multi-Resistant-Protein) ayant des fonctions similaires, pouvaient aussi être responsables du même processus d'efflux. N'ayant pas d'anticorps disponible contre cette dernière protéine, nous avions l'activité d'efflux en étudiant le relargage éventuel du Hoechst 33342 (un substrat de la Pgp170 de la MRP) par des cellules B16F10 vivantes. Aucune perte de fluorescence n'était observée entre des cellules vivantes colorées au Hoechst 33342 et celles qui étaient marquées, « lavées » dans du tampon PBS (sans Hoechst 33342) et observées par microscopie (Fig-94). Du fait que les cellules B16F10 n'expulsaient pas ce fluorochrome, cette analyse étayait le résultat précédent. Ces cellules n'exprimaient donc pas de « pompe d'efflux » responsables d'une absence de cytotoxicité du 5-ALA sur ces cellules.

c) Etude de l'effet potentiel protecteur de la mélanine

Des résultats très récents démontrent que la dépigmentation de la lignée B16F10 par traitement aux « UV », permet d'obtenir une inhibition de la croissance après traitement photodynamique avec le 5-ALA [501,527]. Aussi, pouvant disposer de la lignée B16G4F (proche de la précédente) mais dépourvue de la capacité de synthétiser de la mélanine, en raison de la mutation du récepteur MC1R, nous voulions savoir si l'absence de la mélanine dans la lignée

B16G4F entrainait une sensibilité des cellules au 5-ALA [572]. Nous avions mis la lignée B16G4F en culture et avions utilisé le même protocole d'induction que pour l'autre lignée. Après l'illumination (temps 0 h), puis à 24 h et 48 h nous avions effectué un test de photocytotoxicité (XTT). Les résultats (Fig-102) confirmaient que l'illumination seule et le 5-ALA seul, n'étaient pas toxiques.

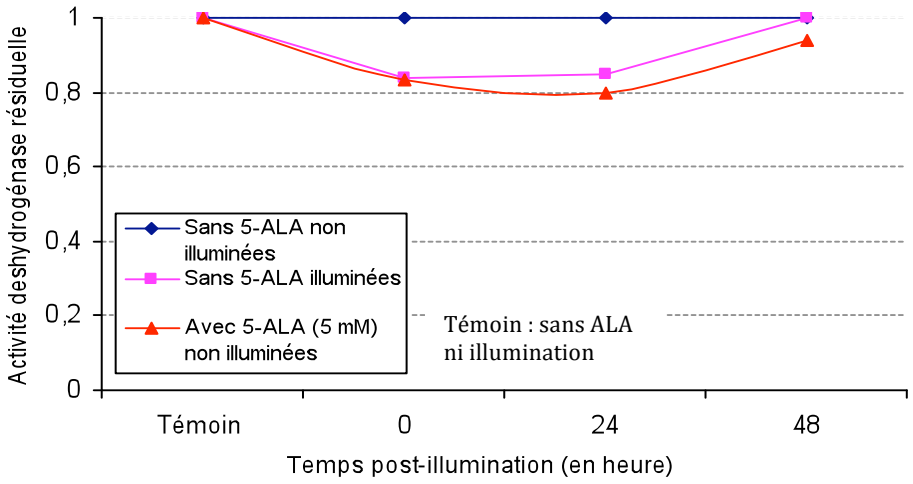


Figure 102 - Etude de la photocytotoxicité en XTT des conditions témoins sur la lignée des mélanocytes B16G4F : 5-ALA (5 mM) seul et illumination en lumière rouge seule.
Témoin : sans ALA ni illumination

Une importante photocytotoxicité du traitement sur cette lignée cellulaire était observée (Fig-103). En effet, dès le temps 0 h, le traitement à 3 mM et 5 mM était toxique pour les cellules B16G4F car une diminution de 56 % et 65 % était observée à 0 h pour les doses de 3 mM et 5 mM respectivement. Cette photocytotoxicité se stabilisait au temps 24 h et semblait diminuer au temps 48 h. A 48 h, la photocytotoxicité semblait être moins importante (environ 35,8 % pour les deux doses) laissant penser la mise en place d'un processus autophagique de cette lignée. Cependant, un seul test XTT était réalisé sur ces cellules et donc il serait nécessaire d'en réaliser d'autres afin de confirmer ces résultats.

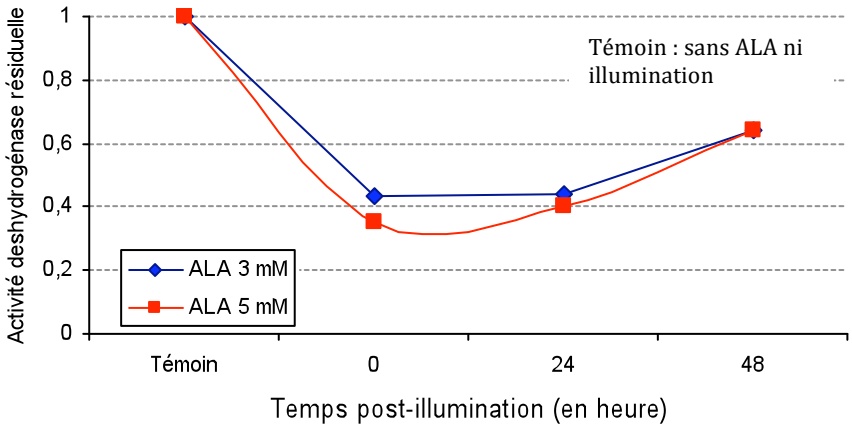
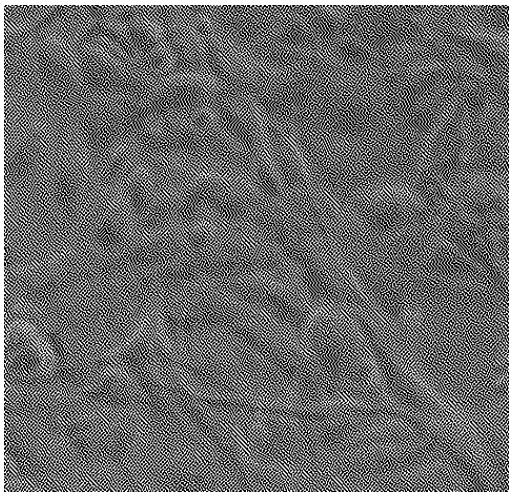
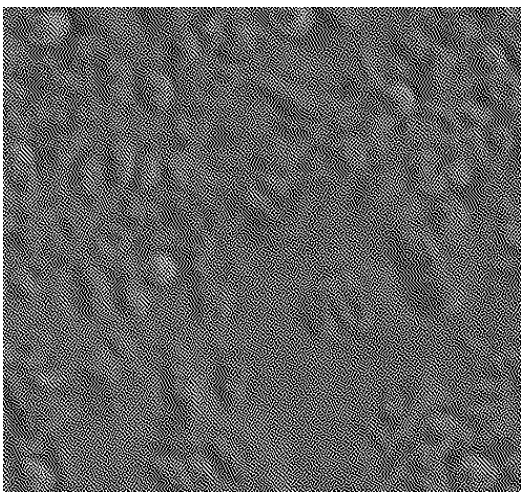


Figure 103 - Etude de la photocytotoxicité en XTT sur la lignée des mélanocytes B16G4 : 5-ALA (3 mM et 5 mM) combiné à l'illumination en lumière rouge.

De plus, une analyse morphologique de cette lignée cellulaire était effectuée avant et après traitement. Une modification phénotypique significative des cellules B16G4F, 24 h après le traitement à 3 mM et 5 mM en comparaison aux cellules non traitées était observée (Fig-104). En effet, les cellules avaient changé de morphologie (cellules rondes) et s'étaient décollées du support, ce qui laissait présager une mort cellulaire (Fig-104b et 104c).

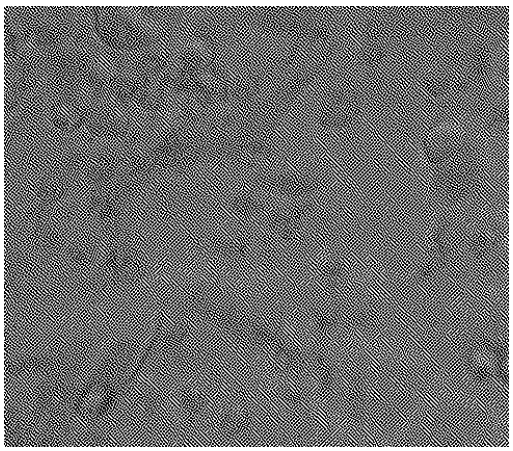
Ainsi, le traitement photodynamique induisait une mortalité sur cette lignée non pigmentée. Il était probable que la mélanine semblait intervenir dans la résistance à ce traitement. Cette dernière serait un obstacle au traitement de la lignée B16F10, par le 5-ALA.





a) B16G4F avant traitement

b) B16G4F traitées à 3 mM (24 h)



c) B16G4F traitées à 5 mM (24 h)

Figure 104 - Observations microscopiques (x 40) des cellules B16G4F non traitées, et traitées au 5-ALA (3 et 5 mM) illuminées en lumière rouge à 24 h.

7. Etude de la signalisation de mort sur la lignée de mélanocytes B16F10 et B16G4F.

On observait une différence d'expression de Beclin-1 au cours du traitement selon les lignées (Fig-105). Dans le cas de la lignée non pigmenté, on notait un processus d'autophagie encore intense à 24h. L'expression de la protéine devenait faible à 24h et disparaissait à 48h dans la lignée pigmentée suggérant l'achèvement du processus d'autophagie.

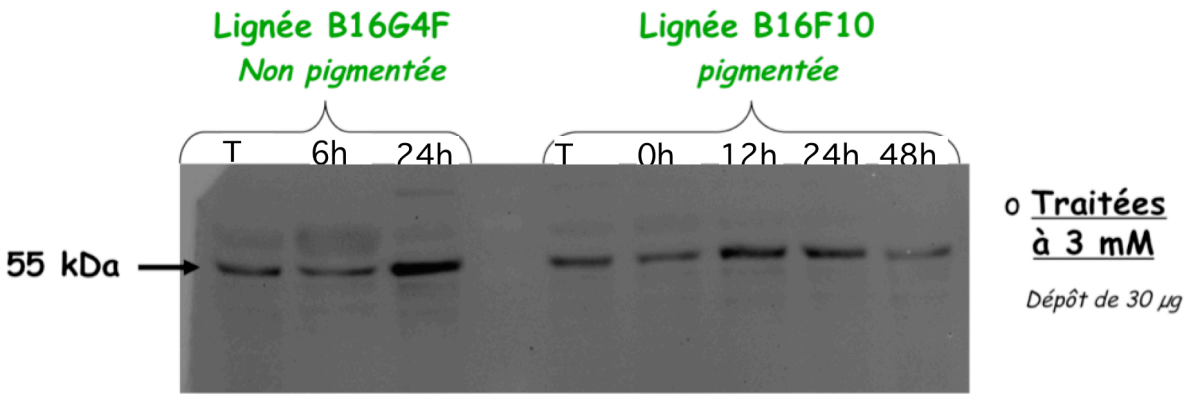


Figure 105 - Expression de Beclin-1 dans les deux lignées après PDT en WB

D- Discussion

La photothérapie dynamique avec l'AAL en lumière rouge a induit une photocytotoxicité modérée seulement pour les doses de 3 et 5 mM (environ 30 % de diminution de l'activité deshydrogénase à 48 h). L'étude morphologique des B16F10 en microscopie inversée en lumière blanche permettait d'observer l'arrondissement de certaines cellules après l'illumination, laissant supposer une signalisation de mort très modérée.

Ce résultat a été étayé par l'analyse en cytométrie en flux où, même pour la dose la plus forte d'AAL (5 mM), un faible nombre de cellules ayant des caractéristiques d'apoptose est observé au temps 0 h post-illumination (31 %), ce taux diminuant au cours du temps. Les cellules B16F10 soumises au traitement photodynamique ont un potentiel membranaire mitochondrial diminué. Cette relative toxicité dans les conditions testées a été corroborée par l'étude de la condensation de la chromatine après coloration au Hoechst 33342 ne révélant pas d'altérations de l'organisation nucléaire, ainsi que par l'absence d'expression de la p53 (évaluée par western blot) avec les concentrations permettant d'obtenir une phototoxicité mesurable. Il semblait que les cellules B16F10 résistaient au traitement photodynamique, dans les conditions déterminées.

Néanmoins, la minime photocytotoxicité obtenue au temps 0 h, 24 h et 48 h laissait supposer que le traitement appliqué induisait une voie de signalisation de mort au sein de certaines cellules. L'étude de certains marqueurs de l'autophagie, mécanisme d'adaptation et de survie a montré un probable processus d'autophagie.

Différents paramètres peuvent expliquer la faible efficacité du traitement. Les conditions d'illumination ont été modifiées : diminution du volume du milieu de culture (en pensant que le liquide pourrait protéger les mélanocytes de l'illumination) et sa nature (DMEM sans rouge de Phénol, remplacement pendant l'illumination par du PBS), les temps d'incubation, le fractionnement de l'illumination (permettant la réoxygénation des cellules et optimisant l'efficacité de la PTD). D'autres essais ont été effectués en retirant le couvercle de la plaque. En effet, la lumière pourrait être diffractée et par conséquent diminuer l'effet de l'illumination sur les cellules B16F10. Cependant, pour chaque condition, aucune différence significative n'a été obtenue en comparaison avec les essais réalisés précédemment.

Pour vérifier l'incorporation du 5-ALA dans les cellules, puis sa conversion en protoporphyrine IX, il aurait été intéressant de doser la fluorescence de cette dernière.

Une autre explication possible à l'efficacité limitée du traitement pouvait être l'expression à la membrane d'une pompe d'efflux, empêchant l'accumulation du 5-ALA. Ces pompes, appartiennent à la super famille des proteines ABC. Elles sont particulièrement exprimées par les cellules tumorales. Parmi elles, la P-glycoprotéine 170 est souvent mise en cause, notamment dans les mélanomes. Nous avons recherché sa présence en réalisant un immunomarquage. Aucune fluorescence spécifique correspondant à son expression n'a été détectée dans les cellules B16F10. L'absence d'efflux du Hoechst 33342 dans les cellules B16F10, non fixées, permettait d'étayer l'absence de cette pompe ou d'une autre protéine ABC ayant les mêmes fonctions.

La mélanine pourrait représenter un obstacle à l'efficacité de la PTD. En effet, il a été démontré dans des travaux récents que la photothérapie dynamique n'est pas indiquée dans la prise en charge des mélanomes cutanés, en raison, notamment, de la pigmentation qui s'oppose à une bonne pénétration de la lumière [501]. Ceci pourrait être dû à une compétition des coefficients d'absorption entre la mélanine et la porphyrine. Pour tester cette hypothèse, un test de phototoxicité cellulaire sur une lignée de mélanocytes proche, non pigmentée (B16G4F), dans les mêmes conditions que la lignée de mélanocytes pigmentées (B16F10), a été réalisé. Une chute de l'activité deshydrogénase résiduelle était observée dès le temps 0 h post-illumination, suggérant que la pigmentation joue un rôle protecteur fondamental. Les mélanocytes dépourvus de mélanine paraissaient plus sensibles au traitement photodynamique comme le suggérant des modifications morphologiques observées en microscopie, majeures laissant supposer une voie de signalisation de mort.

Cependant, l'activité deshydrogénase reprenait dès le temps 24 h et se poursuivait au temps 48 h, suggérant une activation d'un processus de réparation et de recyclage en réponse au stress induit. La recherche d'un marqueur de l'autophagie a été réalisée. La différence d'expression de Beclin-1 selon les lignées après le traitement photodynamique laisse supposer qu'il existe un processus d'autophagie plus marqué dans la lignée dépourvue de mélanine.

L'autophagie peut avoir un rôle anti-tumoral ou pro-tumoral en permettant la survie des cellules tumorales[574]. Cela pourrait expliquer un rôle anti-tumoral dans les mélanomes non pigmentés et un rôle pro-tumoral dans les mélanomes pigmentés [551]. En effet, l'autophagie dans les mélanomes a été incriminée dans les processus de résistance au traitement[552]. Le type de mort paraît être influencé par l'existence ou non de la pigmentation lors de PTD avec l'hypericin. Une mort par nécrose serait observée sur des cellules pigmentées et une mort par apoptose pour les cellules dépigmentées[81]. Le mélanosome pourrait alors jouer un rôle central de cible de la PTD.

Davids *et al* concluaient que la PTD avec une source d'UVA provoquait une réponse cytoprotectrice initiale par un processus d'autophagie et que les doses de PS et l'existence de pigment entraînaient des voies de signalisation de mort différente[575]. La mélanine est un puissant antioxydant qui pourrait expliquer ce phénomène de résistance[576].

E- Conclusion

La PTD en lumière rouge avec AAL est plus efficace sur des mélanocytes tumoraux non pigmentés que sur des mélanocytes pigmentés. Elle soulève le rôle protecteur de la mélanine vis-à-vis des rayonnements externes et émet l'hypothèse d'un mécanisme de résistance autophagique. Ce dernier lorsqu'il est dépassé peut aboutir à l'orientation de la cellule vers les voies de signalisation de mort cellulaire. Notre travail permet d'introduire une notion récente de voie de signalisation autophagique au cours des mélanomes. Ce processus pourrait expliquer la résistance des mélanomes aux traitements par PTD.

Conclusion générale et Perspectives

La photothérapie dynamique topique est une modalité thérapeutique innovante se développant dans le domaine de la cancérologie cutanée depuis ces 15 dernières années. La majorité des travaux et des études s'est intéressée aux kératoses actiniques, aux carcinomes basocellulaires superficiels et nodulaires et enfin aux maladies de Bowen.
Les études sur le mélanome sont plus restreintes et sont controversées. Un certain nombre d'entre elles démontrent des résultats insuffisants et décevants compte tenu de la présence de mélanine et de la profondeur des métastases cutanées. A l'inverse d'autres auteurs présentent des travaux encourageant en modifiant les propriétés physico-chimiques des photosensibilisants et les protocoles d'illumination (lumière de longueur d'onde différente, intensité lumineuse…).

Le laboratoire de chimie et des substances naturelles nous a permis d'évaluer biologiquement une porphyrine de synthèse enrichie en glucide et vectorisée pour permettre d'optimiser l'efficacité de la PTD sur les mélanocytes tumoraux murins.
Dans la première partie de l'étude, nous avons démontré un effet photodynamique directe d'une porphyrine de synthèse, enrichie en groupement glucidique et vectorisée par le motif RGD, la Triglucosylporphyrine-RGD, hydrosoluble en lumière rouge. On notait un effet direct de la PTD sur les B16F10 et EJG. La PTD avec cette porphyrine de synthèse induisait une diminution significative de la viabilité des deux populations de cellules étudiées. L'efficacité de cette porphyrine de synthèse est comparable à la molécule de référence le Photofrin® avec cependant une clairance d'élimination bien plus rapide.

La longueur d'onde d'excitation optimale de cette porphyrine de synthèse est de 417 nm en lumière bleue. Elle est excitable dans le rouge mais nécessite des concentrations importantes à toxicité variable selon les tissus *in vitro* ne permettant un développement de cette molécule en clinique humaine. L'intensité lumineuse de 10 J/cm^2 utilisée en lumière bleue a été à l'origine d'une photodestruction massive de la porphyrine de synthèse et a ensuite donné naissance à un nouvel axe de recherche parallèle pour expliquer la photocytotoxicité de la lumière bleue sur les B16F10.

La lumière bleue est phototoxique sur les mélanocytes. Nous rapportons les résultats préliminaires d'efficacité de la lumière bleue utilisée seule sur des métastases cutanées de mélanome chez l'homme. Cependant, la compréhension du mécanisme reste non élucidée. Les doses de lumière bleue et le stade de développement de la cellule, son caractère tumoral ou non, primitif ou métastatique pourraient influencer la réponse. L'hypothèse de l'existence de récepteur à la lumière bleue, les cryptochromes, sur les mélanocytes cutanés pourrait être les perspectives d'un travail futur. En effet, la découverte de récepteurs sur les mélanocytes choroïdiens suggère cet axe de recherche.

La réalisation d'une étude anatomo-clinique chez des patients atteints de métastases cutanées de mélanomes pourrait permettre l'élucider la compréhension des mécanismes sous la forme d'un protocole hospitalier de recherche clinique.

Afin de comprendre les mécansimes de résistance des mélanocytes à la PTD, notre étude s'est orientée vers la compréhension des mécanismes de voies de signalisation de la mort cellulaire. L'autophagie pourrait être un mécanisme enclenché lors de la PTD et apparaitrait en fonction de paramètres variables (photosensibilisant, dosimétrie…).

Annexes

Tableau 6 - Solutions pour la préparation des gels de séparation et de concentration pour un gel d'électrophorèse SDS-polyacrylamide Tris-glycine.

% de polyacrylamide final / Réactifs (volume en mL)	10 %	12 %
H_2O distillée	7,9	6,6
30 % acrylamide/bisacrylamide	6,7	8,0
1,5 M Tris (pH : 8,8)	5,0	5,0
10 % SDS	0,2	0,2
10 % APS	0,2	0,2
TEMED	0,008	0,008

Solutions pour préparer un gel de résolution 10 % et 12 %.

Réactifs (volume en mL)	Pour 6 mL
H_2O distillée	4,1
30 % acrylamide/bisacrylamide	1,0
1,5 M Tris (pH : 6,8)	0,75
10 % SDS	0,06
10 % APS	0,06
TEMED	0,006

Solutions pour préparer un gel de concentration 5%.

Tableau 7 : **Composition des différents tampons utilisés pour le western blot.**

- Tampon de charge 2X : Eau désionisée
  Tris HCl 0,5 M, pH 6,8
  Glycérol
  SDS 10 %
  Bleu de bromophénol 0,5 %

- Tampon de migration 10X **:** Tris base, 0,25 M (PROMEGA), pH 8,3
  Glycine, 1,92 M (amino acid)
  SDS 1 %

- Tampon de transfert : Tris base 25 mM, pH 8,5
  Glycine 0,2 M
  Méthanol 20 %

Tableau 8 : **Anticorps primaires et secondaires utilisés en WB.**

Anticorps*	Nature	Dilution	Solution	Temps d'incubation	Fournisseur
p53 (clone DO-1)	Monoclonal de souris (IgG2A)	1/100e	0,1 % TBS-Tween-20 5 % lait	2 h à température ambiante	Santa Cruz Biotechnology
Actine	Monoclonal de lapin (IgG)	1/500	0,1 % TBS-Tween-20 5 % lait	2 h à température ambiante	BD Biosciences
Beclin 1 (E-8)	Monoclonal de Souris (IgG2A)	1/100e	0,1 % TBS-Tween-20 5 % lait	2 h à température ambiante	Santa Cruz Biotechnology

***Anticorps primaires utilisés en WB.**

Anticorps*	Dilution	Solution	Temps d'incubation	Fournisseur
Anti-Ig de souris Anti-Ig de lapin	1/2000e	0,1 % TBS-Tween-20 5 % lait	2 h à température ambiante	Santa Cruz Biotechnology

***Anticorps secondaires utilisés en WB.**

Communication orale

1. A Sparsa, K Faucher, P Krausz, M Guilloton, F Sturtz, C Bédane. Efficacité de porphyrines à motif RGD sur des mélanocytes tumoraux murins : résultats préliminaires. Congrès Annuel de Recherche en Dermatologie. 27-28 Mai 2005 Brest. J Invest Dermatol 2005 ; 125 : A14.

Abstract

EFFICACITE DE PORPHYRINES A MOTIF RGD SUR DES MELANOCYTES TUMORAUX MURINS : RESULTATS PRELIMINAIRES. **A Sparsa***, K Faucher**, P Krausz***, M Guilloton***, F Sturtz**, C Bédane*.*Dermatologie, ** Equipe Accueil Médecine Moléculaire Humaine (EA3839), CHU Dupuytren, ***Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (UPRES EA 1069), Faculté des Sciences, Limoges, France.

L'utilisation de la photothérapie dynamique dans le mélanome reste controversée. Afin d'augmenter la spécificité des porphyrines, le motif RGD a été greffé sur la porphyrine. Ce motif est capable de se lier spécifiquement sur une integrine de surface α5β3 exprimée par les mélanocytes tumoraux et les cellules endothéliales. Nous rapportons des résultats préliminaires sur l'efficacité de nouvelles porphyrines sur des mélanocytes tumoraux murins (B16F10) et sur des cellules endothéliales bovines (EJG).

Matériels et Méthodes : La synthèse de Para-Triglycosyl- RGD porphyrine et Ortho-TG-RGD a été réalisé et précédemment publiée. Les B16F10 et EJG ont été cultivées dans des puits. Les PS ont été ajoutées à J3 de l'encemencement. L'irradiation à 10J/cm^2, en lumière bleue, avec la Lampe Waldman était réalisée après 3h d'incubation à l'obscurité. Un test colorimétrique MTT était effectué après irradiation, à J1, J2, J3, J4 afin de déterminer les concentrations cytotoxiques et phototoxiques.

Résultats : La porphyrine oTG-RGD est phototoxique et non cytotoxique à la concentration de 10^{-5}M sur les B16F10, provoquant 60% de mortalité cellulaire à J2. La pTG-RGD est phototoxique et non cytotoxique sur les B16F10 à 10^{-4}M, provoquant une mortalité cellulaire de 90%. A ces concentrations, les porphyrines sont cytotoxiques sur les EJG. La pTG-RGD est phototoxique et non cytotoxique à 10^{-9}M sur les EJG.

Conclusion

Ces résultats montrent l'efficacité de la PDT sur les mélanocytes tumoraux avec de nouvelles porphyrines-RGD. L'étude de porphyrine sans le motif RGD sont en cours afin d'affiner la spécificité.

Communication Affichée

1. A Sparsa, K Faucher, V Sol, P Krausz, M Guilloton, F Sturtz, C Bédane. Efficacy of RGD-Porphyrins on murine tumoral melanocytes : Preliminary results. 35th Annual European Society For dermatological Research Meeting 22-24 September 2005, Tübingen, Germany. J Invest Dermatol 2005; 125: A 65.

Abstract

EFFICACY OF RGD-PORPHYRINS ON MURINE TUMORAL MELANOCYTES: PRELIMINARY RESULTS. **A Sparsa***, K Faucher**, V Sol***, P Krausz***, M Guilloton***, F Sturtz**, C Bédane*. *Dermatologie, ** Equipe Accueil Médecine Moléculaire Humaine (EA3839), CHU Dupuytren, ***Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (UPRES EA 1069), Faculté des Sciences, Limoges, France.

Background

Photodynamic therapy (PDT) is mediated by reactive oxygen species after activation of a photosensitizer by light. PDT remains controversial for melanoma treatment. This is due the poor light penetration of the activating 630nm light into melanin-rich tissue with sodic porphymer PDT. To increase their specificity RGD function has been grafted on porphyrins. RGD binds specifically on cell surface integrin α5β3 which is expressed by tumour melanocytes and endothelial cells. We report herein some preliminary results concerning the efficacy of newly synthetized porphyrins on murine melanocytes (B16F10) and bovine endothelial cells (EJG).

Materiel and Methods

Para-Triglycosyl-RGD porphyrin and Ortho-TG-RGD synthesis have been previously published. B16F10 and EJG cells have been cultured in wells. Porphyrins were added after 3 days. Irradiation was performed with 10J/cm^2, blue light, (*450 nm* Wavelenght) after 3 hours incubation. Colorimetric MTT test was performed after irradiation, at day 1, 2, 3, and 4 to determine cytotoxic and phototoxic porphyrin concentrations.

Result

oTG-RGD porphyrin is phototoxic and not cytotoxic at 10^{-5}M concentration on B16F10, inducing 60% of cell death at day 2. pTG-RGD porphyrin is phototoxic and not cytotoxic on B16F10 at 10^{-4}M concentration, inducing 90% cell death At these concentrations porphyrins are cytotoxic on EJG. pTG-RGD porphyrin is phototoxic and not cytotoxic on EJG (10^{-9}M). Percentage of cell mortality is comparable to rate of cell mortality with Photofrin (15µg/ml).

Conclusion

These results suggest that PDT using new RGD-porphyrins is active on tumour melanocytes. Various types of porphyrins are being synthetised and evaluated to further precise their activity and specificity.

2. A Sparsa, K Faucher, V Sol, P Krausz, M Guilloton, F Sturtz, C Bédane. Efficacy of RGD-Porphyrins on Murine Tumoral Melanocytes : Preliminary results. 11th Congress of the European Society for Photobiology, 3-8 September 2005, Aix-Les-Bains.

Bibliographie

1 Hopper C. Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol* 2000; 1: 212-9.

2 Hahn SM, Smith RP, Friedberg J. Photodynamic therapy for mesothelioma. *Curr Treat Options Oncol* 2001; 2: 375-83.

3 Peng Q, Warloe T, Berg K *et al.* 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges. *Cancer* 1997; 79: 2282-308.

4 Levy JG. Photodynamic therapy. *Trends Biotechnol* 1995; 13: 14-8.

5 Kennedy JC, Pottier RH, Pross DC. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. *J Photochem Photobiol B* 1990; 6: 143-8.

6 Basset-Seguin N, Ibbotson SH, Emtestam L *et al.* Topical methyl aminolaevulinate photodynamic therapy versus cryotherapy for superficial basal cell carcinoma: a 5 year randomized trial. *Eur J Dermatol* 2008; 18: 547-53.

7 Mimura S, Ito Y, Nagayo T *et al.* Cooperative clinical trial of photodynamic therapy with photofrin II and excimer dye laser for early gastric cancer. *Lasers Surg Med* 1996; 19: 168-72.

8 Jaracz S, Chen J, Kuznetsova LV *et al.* Recent advances in tumor-targeting anticancer drug conjugates. *Bioorg Med Chem* 2005; 13: 5043-54.

9 Crippa PR, Cristofoletti V, Romeo N. A band model for melanin deducted from optical absorption and photoconductivity experiments. *Biochim Biophys Acta* 1978; 538: 164-70.

10 Carre V, Jayat C, Granet R *et al.* Chronology of the apoptotic events induced in the K562 cell line by photodynamic treatment with hematoporphyrin and monoglucosylporphyrin. *Photochem Photobiol* 1999; 69: 55-60.

11 Silva JN, Filipe P, Morliere P *et al.* Photodynamic therapies: principles and present medical applications. *Biomed Mater Eng* 2006; 16: S147-54.

12 Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW *et al.* Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998; 90: 889-905.

13 Moan J, Peng Q. An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Res* 2003; 23: 3591-600.

14 Raab O. Ueber die wirkung fluoreszierenden stoffe auf infusorien. *Z Biol* 1900; 39: 524-6.

15 Von Tappenier H JA. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoff. *Muench Med Wochschr* 1903; 1: 2042-4.

16 Jesionek A, Von Tappeiner, H. On the treatment of the skin cancers with fluorescent substances. *Arch Klin Med* 1905; 82: 223-7.

17 Meyer-Betz F. Untersuchungen über die biologische (photodynamische) wirkubg des hämatoporphyrins und anderer derivative des blut- und gallenfarbstoffs. *Dtsch Arch Klin Med* 1913; 112: 476-503.

18 Policard A. Etudes sur les aspects offerts par les tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood. *C. R. Soc Biol* 1924; 91: 1422-8.

19 Auler H, Banzer G. Untersuchungen tiber die Rolle der porphyrine bei geschwulstkranken Menschen und Tieren. *Z Krebsforschung* 1942; 53: 65-8.

20 Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J Natl Cancer Inst* 1961; 26: 1-11.

21 Lipson RL, Baldes EJ. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivatives. *Arch Dermatol* 1960; 82: 508-16.

22 Dougherty TJ. Photosensitizers: therapy and detection of malignant tumors. *Photochem Photobiol* 1987; 45: 879-89.

23 Wagnieres GA, Star WM, Wilson BC. In vivo fluorescence spectroscopy and imaging for oncological applications. *Photochem Photobiol* 1998; 68: 603-32.

24 Profio AE, Balchum OJ. Fluorescence diagnosis of cancer. *Adv Exp Med Biol* 1985; 193: 43-50.

25 Kriegmair M, Zaak D, Knuechel R *et al.* Photodynamic cystoscopy for detection of bladder tumors. *Semin Laparosc Surg* 1999; 6: 100-3.

26 Jocham D, Stepp H, Waidelich R. Photodynamic diagnosis in urology: state-of-the-art. *Eur Urol* 2008; 53: 1138-48.

27 Kriegmair M, Zaak D, Stepp H *et al.* Transurethral resection and surveillance of bladder cancer supported by 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence endoscopy. *Eur Urol* 1999; 36: 386-92.

28 Berg K, Selbo PK, Weyergang A *et al.* Porphyrin-related photosensitizers for cancer imaging and therapeutic applications. *J Microsc* 2005; 218: 133-47.

29 Plaetzer K, Krammer B, Berlanda J *et al.* Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci* 2009; 24: 259-68.

30 Henderson BW, Bellnier DA. Tissue localization of photosensitizers and the mechanism of photodynamic tissue destruction. *Ciba Found Symp* 1989; 146: 112-25; discussion 25-30.

31 Moan J, Sommer S. Oxygen dependence of the photosensitizing effect of hematoporphyrin derivative in NHIK 3025 cells. *Cancer Res* 1985; 45: 1608-10.

32 Mitchell JB, McPherson S, DeGraff W *et al.* Oxygen dependence of hematoporphyrin derivative-induced photoinactivation of Chinese hamster cells. *Cancer Res* 1985; 45: 2008-11.

33 Mitra S, Cassar SE, Niles DJ *et al.* Photodynamic therapy mediates the oxygen-independent activation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cancer Ther* 2006; 5: 3268-74.

34 Ji Z, Yang G, Shahzidi S *et al.* Induction of hypoxia-inducible factor-1alpha overexpression by cobalt chloride enhances cellular resistance to photodynamic therapy. *Cancer Lett* 2006; 244: 182-9.

35 Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photoinactivation of a murine tumor. *Cancer Res* 1976; 36: 2326-9.

36 Henderson BW, Dougherty TJ. How does photodynamic therapy work? *Photochem Photobiol* 1992; 55: 145-57.

37 Hatz S, Lambert JD, Ogilby PR. Measuring the lifetime of singlet oxygen in a single cell: addressing the issue of cell viability. *Photochem Photobiol Sci* 2007; 6: 1106-16.

38 Hatz S, Poulsen L, Ogilby PR. Time-resolved singlet oxygen phosphorescence measurements from photosensitized experiments in single cells: effects of oxygen diffusion and oxygen concentration. *Photochem Photobiol* 2008; 84: 1284-90.

39 Vaupel P, Schlenger K, Knoop C *et al.* Oxygenation of human tumors: evaluation of tissue oxygen distribution in breast cancers by computerized O2 tension measurements. *Cancer Res* 1991; 51: 3316-22.

40 Bonnett R. Progress with heterocyclic photosensitizers for photodynamic therapy of tumours. *J Heterocycl Chem* 2002; 39: 455-70.

41 Mang TS, Dougherty TJ, Potter WR *et al.* Photobleaching of porphyrins used in photodynamic therapy and implications for therapy. *Photochem Photobiol* 1987; 45: 501-6.

42 Potter WR, Mang TS, Dougherty TJ. The theory of photodynamic therapy dosimetry: consequences of photo-destruction of sensitizer. *Photochem Photobiol* 1987; 46: 97-101.

43 Moan J, Berg K. Photochemotherapy of cancer: experimental research. *Photochem Photobiol* 1992; 55: 931-48.

44 Agarwal ML, Clay ME, Harvey EJ *et al.* Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res* 1991; 51: 5993-6.

45 Yang JZ, Van Vugt DA, Kennedy JC *et al.* Intrauterine 5-aminolevulinic acid induces selective fluorescence and photodynamic ablation of the rat endometrium. *Photochem Photobiol* 1993; 57: 803-7.

46 Leist M, Nicotera P. The shape of cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 236: 1-9.

47 Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP *et al.* Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1704: 59-86.

48 Wyld L, Reed MW, Brown NJ. Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *Br J Cancer* 2001; 84: 1384-6.

49 Henderson BW, Busch TM, Snyder JW. Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 489-93.

50 Vantieghem A, Assefa Z, Vandenabeele P *et al.* Hypericin-induced photosensitization of HeLa cells leads to apoptosis or necrosis. Involvement of cytochrome c and procaspase-3 activation in the mechanism of apoptosis. *FEBS Lett* 1998; 440: 19-24.

51 Plaetzer K, Kiesslich T, Krammer B *et al.* Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to AlPcS4-PDT. *Photochem Photobiol Sci* 2002; 1: 172-7.

52 Barrett AJ, Kennedy JC, Jones RA *et al.* The effect of tissue and cellular pH on the selective biodistribution of porphyrin-type photochemotherapeutic agents: a volumetric titration study. *J Photochem Photobiol B* 1990; 6: 309-23.

53 Peng Q, Moan J, Nesland JM. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. *Ultrastruct Pathol* 1996; 20: 109-29.

54 Moan J, Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 1991; 53: 549-53.

55 Kessel D, Vicente MG, Reiners JJ, Jr. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 482-8.

56 Kessel D, Reiners JJ, Jr. Apoptosis and autophagy after mitochondrial or endoplasmic reticulum photodamage. *Photochem Photobiol* 2007; 83: 1024-8.

57 Korbelik M. Induction of tumor immunity by photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg* 1996; 14: 329-34.

58 Korbelik M, Krosl G, Krosl J *et al.* The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy. *Cancer Res* 1996; 56: 5647-52.

59 Krosl G, Korbelik M, Dougherty GJ. Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. *Br J Cancer* 1995; 71: 549-55.

60 Gollnick SO, Liu X, Owczarczak B *et al.* Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as a result of photodynamic therapy in vivo. *Cancer Res* 1997; 57: 3904-9.

61 de Vree WJ, Essers MC, de Bruijn HS *et al.* Evidence for an important role of neutrophils in the efficacy of photodynamic therapy in vivo. *Cancer Res* 1996; 56: 2908-11.

62 Luna MC, Wong S, Gomer CJ. Photodynamic therapy mediated induction of early response genes. *Cancer Res* 1994; 54: 1374-80.

63 Tao J, Sanghera JS, Pelech SL *et al.* Stimulation of stress-activated protein kinase and p38 HOG1 kinase in murine keratinocytes following photodynamic therapy with benzoporphyrin derivative. *J Biol Chem* 1996; 271: 27107-15.

64 Gomer CJ, Luna M, Ferrario A *et al.* Cellular targets and molecular responses associated with photodynamic therapy. *J Clin Laser Med Surg* 1996; 14: 315-21.

65 He J, Agarwal ML, Larkin HE *et al.* The induction of partial resistance to photodynamic therapy by the protooncogene BCL-2. *Photochem Photobiol* 1996; 64: 845-52.

66 Fisher AM, Danenberg K, Banerjee D *et al.* Increased photosensitivity in HL60 cells expressing wild-type p53. *Photochem Photobiol* 1997; 66: 265-70.

67 Fisher AM, Rucker N, Wong S *et al.* Differential photosensitivity in wild-type and mutant p53 human colon carcinoma cell lines. *J Photochem Photobiol B* 1998; 42: 104-7.

68 Trauner K, Gandour-Edwards R, Bamberg M *et al.* Influence of light delivery on photodynamic synovectomy in an antigen-induced arthritis model for rheumatoid arthritis. *Lasers Surg Med* 1998; 22: 147-56.

69 Leong S, Chan AH, Levy JG *et al.* Transcutaneous photodynamic therapy alters the development of an adoptively transferred form of murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Photochem Photobiol* 1996; 64: 751-7.

70 King DE, Jiang H, Simkin GO *et al.* Photodynamic alteration of the surface receptor expression pattern of murine splenic dendritic cells. *Scand J Immunol* 1999; 49: 184-92.

71 Kick G, Messer G, Goetz A *et al.* Photodynamic therapy induces expression of interleukin 6 by activation of AP-1 but not NF-kappa B DNA binding. *Cancer Res* 1995; 55: 2373-9.

72 Ryter SW, Gomer CJ. Nuclear factor kappa B binding activity in mouse L1210 cells following photofrin II-mediated photosensitization. *Photochem Photobiol* 1993; 58: 753-6.

73 Matroule JY, Volanti C, Piette J. NF-kappaB in photodynamic therapy: discrepancies of a master regulator. *Photochem Photobiol* 2006; 82: 1241-6.

74 Volanti C, Matroule JY, Piette J. Involvement of oxidative stress in NF-kappaB activation in endothelial cells treated by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2002; 75: 36-45.

75 Volanti C, Gloire G, Vanderplasschen A *et al.* Downregulation of ICAM-1 and VCAM-1 expression in endothelial cells treated by photodynamic therapy. *Oncogene* 2004; 23: 8649-58.

76 Roland CL, Harken AH, Sarr MG *et al.* ICAM-1 expression determines malignant potential of cancer. *Surgery* 2007; 141: 705-7.

77 Robertson CA, Evans DH, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *J Photochem Photobiol B* 2009; 96: 1-8.

78 Nowis D, Makowski M, Stoklosa T *et al.* Direct tumor damage mechanisms of photodynamic therapy. *Acta Biochim Pol* 2005; 52: 339-52.

79 Santonocito C, Concolino P, Lavieri MM *et al.* Comparison between three molecular methods for detection of blood melanoma tyrosinase mRNA. Correlation with melanoma stages and S100B, LDH, NSE biochemical markers. *Clin Chim Acta* 2005; 362: 85-93.

80 Huang YH, Lee TH, Chan KJ *et al.* Anemonin is a natural bioactive compound that can regulate tyrosinase-related proteins and mRNA in human melanocytes. *J Dermatol Sci* 2008; 49: 115-23.

81 Davids LM, Kleemann B, Kacerovska D *et al.* Hypericin phototoxicity induces different modes of cell death in melanoma and human skin cells. *J Photochem Photobiol B* 2008; 91: 67-76.

82 Ketabchi A, MacRobert A, Speight PM *et al.* Induction of apoptotic cell death by photodynamic therapy in human keratinocytes. *Arch Oral Biol* 1998; 43: 143-9.

83 MacCormack MA. Photodynamic therapy in dermatology: an update on applications and outcomes. *Semin Cutan Med Surg* 2008; 27: 52-62.

84 Brancaleon L, Moseley H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. *Lasers Med Sci* 2002; 17: 173-86.

85 Soler AM, Angell-Petersen E, Warloe T *et al.* Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinoma with 5-aminolevulinic acid with dimethylsulfoxide and ethylendiaminetetraacetic acid: a comparison of two light sources. *Photochem Photobiol* 2000; 71: 724-9.

86 Clark C, Bryden A, Dawe R *et al.* Topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for cutaneous lesions: outcome and comparison of light sources. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2003; 19: 134-41.

87 Svaasand LO. Photodynamic and photohyperthermic response of malignant tumors. *Med Phys* 1985; 12: 455-61.

88 Ficheux H. Principes et applications thérapeutiques de la photothérapie dynamique. *Ann Pharm Fr* 2009; 67: 32-40.

89 Ericson MB, Sandberg C, Stenquist B *et al.* Photodynamic therapy of actinic keratosis at varying fluence rates: assessment of photobleaching, pain and primary clinical outcome. *Br J Dermatol* 2004; 151: 1204-12.

90 Foster TH, Murant RS, Bryant RG *et al.* Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. *Radiat Res* 1991; 126: 296-303.

91 Babilas P, Schacht V, Liebsch G *et al.* Effects of light fractionation and different fluence rates on photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid in vivo. *Br J Cancer* 2003; 88: 1462-9.

92 Bruls WA, Slaper H, van der Leun JC *et al.* Transmission of human epidermis and stratum corneum as a function of thickness in the ultraviolet and visible wavelengths. *Photochem Photobiol* 1984; 40: 485-94.

93 Peng Q, Berg K, Moan J *et al.* 5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy: principles and experimental research. *Photochem Photobiol* 1997; 65: 235-51.

94 Manyak MJ, Russo A, Smith PD *et al.* Photodynamic therapy. *J Clin Oncol* 1988; 6: 380-91.

95 Morton CA, Whitehurst C, Moore JV *et al.* Comparison of red and green light in the treatment of Bowen's disease by photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 2000; 143: 767-72.

96 Fritsch C, Stege H, Saalmann G *et al.* Green light is effective and less painful than red light in photodynamic therapy of facial solar keratoses. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1997; 13: 181-5.

97 Dijkstra AT, Majoie IM, van Dongen JW *et al.* Photodynamic therapy with violet light and topical 6-aminolaevulinic acid in the treatment of actinic keratosis, Bowen's disease and basal cell carcinoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001; 15: 550-4.

98 Young S, Bolton P, Dyson M *et al.* Macrophage responsiveness to light therapy. *Lasers Surg Med* 1989; 9: 497-505.

99 Iusim M, Kimchy J, Pillar T *et al.* Evaluation of the degree of effectiveness of biobeam low level narrow band light on the treatment of skin ulcers and delayed postoperative wound healing. *Orthopedics* 1992; 15: 1023-6.

100 Kessel D, Luo Y. Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *J Photochem Photobiol B* 1998; 42: 89-95.

101 Kessel D, Woodburn K, Gomer CJ *et al.* Photosensitization with derivatives of chlorin p6. *J Photochem Photobiol B* 1995; 28: 13-8.

102 Berg K, Moan J. Lysosomes as photochemical targets. *Int J Cancer* 1994; 59: 814-22.

103 Kessel D, Woodburn K, Henderson BW *et al.* Sites of photodamage in vivo and in vitro by a cationic porphyrin. *Photochem Photobiol* 1995; 62: 875-81.

104 O'Connor AE, Gallagher WM, Byrne AT. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2009; 85: 1053-74.

105 Byrne CJ, Marshallsay LV, Ward AD. The composition of Photofrin II. *J Photochem Photobiol B* 1990; 6: 13-27.

106 Dougherty TJ. Hematoporphyrin as a photosensitizer of tumors. *Photochem Photobiol* 1983; 38: 377-9.

107 Dolmans DE, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 380-7.

108 Abels C. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). *Photochem Photobiol Sci* 2004; 3: 765-71.

109 Benson RC, Jr. Treatment of bladder cancer with hematoporphyrin derivatives and laser light. *Urology* 1988; 31: 13-7.

110 Amano T, Prout GR, Jr., Lin CW. Intratumor injection as a more effective means of porphyrin administration for photodynamic therapy. *J Urol* 1988; 139: 392-5.

111 Detty MR, Gibson SL, Wagner SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem* 2004; 47: 3897-915.

112 Uehlinger P, Zellweger M, Wagnieres G *et al.* 5-Aminolevulinic acid and its derivatives: physical chemical properties and protoporphyrin IX formation in cultured cells. *J Photochem Photobiol B* 2000; 54: 72-80.

113 Lang K, Bolsen K, Stahl W *et al.* The 5-aminolevulinic acid-induced porphyrin biosynthesis in benign and malignant cells of the skin. *J Photochem Photobiol B* 2001; 65: 29-34.

114 Heinemann IU, Jahn M, Jahn D. The biochemistry of heme biosynthesis. *Arch Biochem Biophys* 2008; 474: 238-51.

115 Kennedy JC, Pottier RH. Endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 1992; 14: 275-92.

116 Fukuda H, Casas A, Batlle A. Aminolevulinic acid: from its unique biological function to its star role in photodynamic therapy. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 272-6.

117 Iinuma S, Farshi SS, Ortel B *et al.* A mechanistic study of cellular photodestruction with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrin. *Br J Cancer* 1994; 70: 21-8.

118 Fuchs J, Thiele J. The role of oxygen in cutaneous photodynamic therapy. *Free Radic Biol Med* 1998; 24: 835-47.

119 Sharman WM, Allen CM, van Lier JE. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. *Drug Discov Today* 1999; 4: 507-17.

120 Blume JE, Oseroff AR. Aminolevulinic acid photodynamic therapy for skin cancers. *Dermatol Clin* 2007; 25: 5-14.

121 Pottier RH, Chow YF, LaPlante JP *et al.* Non-invasive technique for obtaining fluorescence excitation and emission spectra in vivo. *Photochem Photobiol* 1986; 44: 679-87.

122 Goff BA, Bachor R, Kollias N *et al.* Effects of photodynamic therapy with topical application of 5-aminolevulinic acid on normal skin of hairless guinea pigs. *J Photochem Photobiol B* 1992; 15: 239-51.

123 Kormeili T, Yamauchi PS, Lowe NJ. Topical photodynamic therapy in clinical dermatology. *Br J Dermatol* 2004; 150: 1061-9.

124 Abels C, Heil P, Dellian M *et al.* In vivo kinetics and spectra of 5-aminolaevulinic acid-induced fluorescence in an amelanotic melanoma of the hamster. *Br J Cancer* 1994; 70: 826-33.

125 Taylor EL, Brown SB. The advantages of aminolevulinic acid photodynamic therapy in dermatology. *J Dermatolog Treat* 2002; 13 S3-11.

126 Hauschild A, Stockfleth E, Popp G *et al.* Optimization of photodynamic therapy with a novel self-adhesive 5-aminolaevulinic acid patch: results of two randomized controlled phase III studies. *Br J Dermatol* 2009; 160: 1066-74.

127 Fiedler DM, Eckl PM, Krammer B. Does delta-aminolaevulinic acid induce genotoxic effects? *J Photochem Photobiol B* 1996; 33: 39-44.

128 Kelty CJ, Brown NJ, Reed MW *et al.* The use of 5-aminolaevulinic acid as a photosensitiser in photodynamic therapy and photodiagnosis. *Photochem Photobiol Sci* 2002; 1: 158-68.

129 Giuntini F, Bourre L, MacRobert AJ *et al.* Improved peptide prodrugs of 5-ALA for PDT: rationalization of cellular accumulation and protoporphyrin IX production by direct determination of cellular prodrug uptake and prodrug metabolization. *J Med Chem* 2009; 52: 4026-37.

130 Ormrod D, Jarvis B. Topical aminolevulinic acid HCl photodynamic therapy. *Am J Clin Dermatol* 2000; 1: 133-9; discussion 40-1.

131 Braathen LR, Szeimies RM, Basset-Seguin N *et al.* Guidelines on the use of photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer: an international consensus. International Society for Photodynamic Therapy in Dermatology, 2005. *J Am Acad Dermatol* 2007; 56: 125-43.

132 Tschen EH, Wong DS, Pariser DM *et al.* Photodynamic therapy using aminolaevulinic acid for patients with nonhyperkeratotic actinic keratoses of the face and scalp: phase IV multicentre clinical trial with 12-month follow up. *Br J Dermatol* 2006; 155: 1262-9.

133 Calzavara-Pinton PG. Repetitive photodynamic therapy with topical delta-aminolaevulinic acid as an appropriate approach to the routine treatment of superficial non-melanoma skin tumours. *J Photochem Photobiol B* 1995; 29: 53-7.

134 Malik Z, Kostenich G, Roitman L *et al.* Topical application of 5-aminolevulinic acid, DMSO and EDTA: protoporphyrin IX accumulation in skin and tumours of mice. *J Photochem Photobiol B* 1995; 28: 213-8.

135 Morton CA, Whitehurst C, McColl JH *et al.* Photodynamic therapy for large or multiple patches of Bowen disease and basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 2001; 137: 319-24.

136 Kurwa HA, Yong-Gee SA, Seed PT *et al.* A randomized paired comparison of photodynamic therapy and topical 5-fluorouracil in the treatment of actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol* 1999; 41: 414-8.

137 Boyle RW, Dolphin D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. *Photochem Photobiol* 1996; 64: 469-85.

138 Peng Q, Soler AM, Warloe T *et al.* Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *J Photochem Photobiol B* 2001; 62: 140-5.

139 Vena FC, Turchiello RF, Laville I *et al.* 5-aminolevulinic acid ester-induced protoporphyrin IX in a murine melanoma cell line. *Lasers Med Sci* 2004; 19: 119-26.

140 Peng Q, Moan J, Warloe T *et al.* Build-up of esterified aminolevulinic-acid-derivative-induced porphyrin fluorescence in normal mouse skin. *J Photochem Photobiol B* 1996; 34: 95-6.

141 De Rosa FS, Marchetti JM, Thomazini JA *et al.* A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro

cutaneous permeation and in vivo protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy. *J Control Release* 2000; 65: 359-66.

142 Casas A, Fukuda H, Di Venosa G *et al.* The influence of the vehicle on the synthesis of porphyrins after topical application of 5-aminolaevulinic acid. Implications in cutaneous photodynamic sensitization. *Br J Dermatol* 2000; 143: 564-72.

143 Pierre MB, Tedesco AC, Marchetti JM *et al.* Stratum corneum lipids liposomes for the topical delivery of 5-aminolevulinic acid in photodynamic therapy of skin cancer: preparation and in vitro permeation study. *BMC Dermatol* 2001; 1: 5.

144 Moloney FJ, Collins P. Randomized, double-blind, prospective study to compare topical 5-aminolaevulinic acid methylester with topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy for extensive scalp actinic keratosis. *Br J Dermatol* 2007; 157: 87-91.

145 Smits T, Moor AC. New aspects in photodynamic therapy of actinic keratoses. *J Photochem Photobiol B* 2009; 96: 159-69.

146 Rhodes LE, de Rie MA, Leifsdottir R *et al.* Five-year follow-up of a randomized, prospective trial of topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy vs surgery for nodular basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 2007; 143: 1131-6.

147 Surrenti T, De Angelis L, Di Cesare A *et al.* Efficacy of photodynamic therapy with methyl aminolevulinate in the treatment of superficial and nodular basal cell carcinoma: an open-label trial. *Eur J Dermatol* 2007; 17: 412-5.

148 Young SW, Woodburn KW, Wright M *et al.* Lutetium texaphyrin (PCI-0123): a near-infrared, water-soluble photosensitizer. *Photochem Photobiol* 1996; 63: 892-7.

149 Shimanovich R, Hannah S, Lynch V *et al.* Mn(II)-texaphyrin as a catalyst for the decomposition of peroxynitrite. *J Am Chem Soc* 2001; 123: 3613-4.

150 Woodburn KW, Fan Q, Kessel D *et al.* Photodynamic therapy of B16F10 murine melanoma with lutetium texaphyrin. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 746-51.

151 Hammer-Wilson MJ, Ghahramanlou M, Berns MW. Photodynamic activity of lutetium-texaphyrin in a mouse tumor system. *Lasers Surg Med* 1999; 24: 276-84.

152 Du KL, Mick R, Busch TM *et al.* Preliminary results of interstitial motexafin lutetium-mediated PDT for prostate cancer. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 427-34.

153 Patel H, Mick R, Finlay J *et al.* Motexafin lutetium-photodynamic therapy of prostate cancer: short- and long-term effects on prostate-specific antigen. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 4869-76.

154 Pandey RK. Recent advances in photodynamic therapy. *J Porphyrins Phthalocyanines* 2000; 4: 368-73.

155 Triesscheijn M, Ruevekamp M, Aalders M *et al.* Comparative sensitivity of microvascular endothelial cells, fibroblasts and tumor cells after in vitro photodynamic therapy with meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin. *Photochem Photobiol* 2004; 80: 236-41.

156 Hopper C, Kubler A, Lewis H *et al.* mTHPC-mediated photodynamic therapy for early oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2004; 111: 138-46.

157 Mitra S, Foster TH. Photophysical parameters, photosensitizer retention and tissue optical properties completely account for the higher photodynamic efficacy of meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin vs Photofrin. *Photochem Photobiol* 2005; 81: 849-59.

158 Baas P, Saarnak AE, Oppelaar H *et al.* Photodynamic therapy with meta-tetrahydroxyphenylchlorin for basal cell carcinoma: a phase I/II study. *Br J Dermatol* 2001; 145: 75-8.

159 Kessel D, Thompson P, Saatio K *et al.* Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine. *Photochem Photobiol* 1987; 45: 787-90.

160 Sacchini V, Melloni E, Marchesini R *et al.* Topical administration of tetrasodium-meso-tetraphenylporphinesulfonate (TPPS) and red light irradiation for the treatment of superficial neoplastic lesions. *Tumori* 1987; 73: 19-23.

161 Sima AA, Kennedy JC, Blakeslee D *et al.* Experimental porphyric neuropathy: a preliminary report. *Can J Neurol Sci* 1981; 8: 105-13.

162 Jezek P, Nekvasil M, Skobisova E *et al.* Experimental photodynamic therapy with MESO-tetrakisphenylporphyrin (TPP) in liposomes leads to disintegration of human amelanotic melanoma implanted to nude mice. *Int J Cancer* 2003; 103: 693-702.

163 Canete M, Villanueva A, Dominguez V *et al.* Meso-tetraphenylporphyrin: photosensitizing properties and cytotoxic effects on cultured tumor cells. *Int J Oncol* 1998; 13: 497-504.

164 Yao J, Zhang W, Sheng C *et al.* Design, synthesis, and in vitro photodynamic activities of benzochloroporphyrin derivatives as tumor photosensitizers. *Bioorg Med Chem Lett* 2008; 18: 293-7.

165 Schmidt-Erfurth U, Hasan T. Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2000; 45: 195-214.

166 Richter AM, Waterfield E, Jain AK *et al.* Photosensitising potency of structural analogues of benzoporphyrin derivative (BPD) in a mouse tumour model. *Br J Cancer* 1991; 63: 87-93.

167 Richter AM, Waterfield E, Jain AK *et al.* In vitro evaluation of phototoxic properties of four structurally related benzoporphyrin derivatives. *Photochem Photobiol* 1990; 52: 495-500.

168 Mang TS, Allison R, Hewson G *et al.* A phase II/III clinical study of tin ethyl etiopurpurin (Purlytin)-induced photodynamic therapy for the treatment of recurrent cutaneous metastatic breast cancer. *Cancer J Sci Am* 1998; 4: 378-84.

169 Primbs GB, Casey R, Wamser K *et al.* Photodynamic therapy for corneal neovascularization. *Ophthalmic Surg Lasers* 1998; 29: 832-8.

170 Josefsen LB, Boyle RW. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. *Met Based Drugs* 2008; 2008: 276109.

171 Rifkin R, Reed B, Hetzel F *et al.* Photodynamic therapy using SnET2 for basal cell nevus syndrome: a case report. *Clin Ther* 1997; 19: 639-41.

172 Kaplan MJ, Somers RG, Greenberg RH *et al.* Photodynamic therapy in the management of metastatic cutaneous adenocarcinomas: case reports from phase 1/2 studies using tin ethyl etiopurpurin (SnET2). *J Surg Oncol* 1998; 67: 121-5.

173 Matsumura H, Akimoto J, Haraoka J *et al.* Uptake and retention of the photosensitizer mono-L-asparthyl chlorine e6 in experimental malignant glioma. *Lasers Med Sci* 2008; 23: 237-45.

174 Ferrario A, Kessel D, Gomer CJ. Metabolic properties and photosensitizing responsiveness of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model. *Cancer Res* 1992; 52: 2890-3.

175 McMahon KS, Wieman TJ, Moore PH *et al.* Effects of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 on vessel constriction, vessel leakage, and tumor response. *Cancer Res* 1994; 54: 5374-9.

176 Nakagawa H, Matsumiya T, Sakaki H *et al.* Expression of vascular endothelial growth factor by photodynamic therapy with mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6) in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2007; 43: 544-50.

177 Kessel D. Pharmacokinetics of N-aspartyl chlorin e6 in cancer patients. *J Photochem Photobiol B* 1997; 39: 81-3.

178 Nelson JS, Roberts WG, Berns MW. In vivo studies on the utilization of mono-L-aspartyl chlorin (NPe6) for photodynamic therapy. *Cancer Res* 1987; 47: 4681-5.

179 Taber SW, Fingar VH, Coots CT *et al.* 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: 2741-6.

180 Kato H, Furukawa K, Sato M *et al.* 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: 103-11.

181 Kujundzic M, Vogl TJ, Stimac D *et al.* A Phase II safety and effect on time to tumor progression study of intratumoral light infusion technology using talaporfin sodium in patients with metastatic colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2007; 96: 518-24.

182 Wong TW, Aizawa K, Sheyhedin I *et al.* Pilot study of topical delivery of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): implication of topical NPe6-photodynamic therapy. *J Pharmacol Sci* 2003; 93: 136-42.

183 Waszkowiak A, Frackowiak D, Wiktorowicz K *et al.* Spectral properties of phthalocyanines incorporated into resting and stimulated human peripheral blood cells. *Acta Biochim Pol* 2002; 49: 633-41.

184 Bachor R, Flotte TJ, Scholz M *et al.* Comparison of intravenous and intravesical administration of chloro-aluminum sulfonated phthalocyanine for photodynamic treatment in a rat bladder cancer model. *J Urol* 1992; 147: 1404-10.

185 Peng Q, Farrants GW, Madslien K *et al.* Subcellular localization, redistribution and photobleaching of sulfonated aluminum phthalocyanines in a human melanoma cell line. *Int J Cancer* 1991; 49: 290-5.

186 Ben-Hur E, Zuk MM, Chin S *et al.* Biodistribution and virus inactivation efficacy of a silicon phthalocyanine in red blood cell concentrates as a function of delivery vehicle. *Photochem Photobiol* 1995; 62: 575-9.

187 George JE, 3rd, Ahmad Y, Varghai D *et al.* Pc 4 photodynamic therapy of U87-derived human glioma in the nude rat. *Lasers Surg Med* 2005; 36: 383-9.

188 Miller JD, Baron ED, Scull H *et al.* Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; 224: 290-9.

189 Stockert JC, Canete M, Juarranz A *et al.* Porphycenes: facts and prospects in photodynamic therapy of cancer. *Curr Med Chem* 2007; 14: 997-1026.

190 Toledano H, Edrei R, Kimel S. Photodynamic damage by liposome-bound porphycenes: comparison between in vitro and in vivo models. *J Photochem Photobiol B* 1998; 42: 20-7.

191 Segalla A, Fedeli F, Reddi E *et al.* Effect of chemical structure and hydrophobicity on the pharmacokinetic properties of porphycenes in tumour-bearing mice. *Int J Cancer* 1997; 72: 329-36.

192 Kessel D, Luo Y. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6: 28-35.

193 Fickweiler S, Abels C, Karrer S *et al.* Photosensitization of human skin cell lines by ATMPn (9-acetoxy-2,7,12,17-tetrakis-(beta-methoxyethyl)-porphycene) in vitro: mechanism of action. *J Photochem Photobiol B* 1999; 48: 27-35.

194 Chen Q, Huang Z, Luck D *et al.* Preclinical studies in normal canine prostate of a novel palladium-bacteriopheophorbide (WST09) photosensitizer for photodynamic therapy of prostate cancers. *Photochem Photobiol* 2002; 76: 438-45.

195 Koudinova NV, Pinthus JH, Brandis A *et al.* Photodynamic therapy with Pd-Bacteriopheophorbide (TOOKAD): successful in vivo treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts. *Int J Cancer* 2003; 104: 782-9.

196 Trachtenberg J, Weersink RA, Davidson SR *et al.* Vascular-targeted photodynamic therapy (padoporfin, WST09) for recurrent prostate cancer after failure of external beam radiotherapy: a study of escalating light doses. *BJU Int* 2008; 102: 556-62.

197 James D, Swany N, Paz N, Hanson R, Ray, R. Synthesis and estrogen receptor binding affinity of a porphyrin-estradiol conjugate for targeted photodynamic therapy of cancer. *Bioorg Med Chem lett* 1999; 16: 2379-84.

198 Schneider R, Schmitt F, Frochot C, Fort Y, Lourette N, Guillemin F, Muller JF, Barberi-Heyod M. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. *Bioorg Med Chem* 2005; 13: 2799-808.

199 Monsigny M, Roche AC, Midoux P. Endogenous lectins and drug targeting. *Ann N Y Acad Sci* 1988; 551: 399-413; discussion -4.

200 Chen X, Hui L, Foster DA *et al.* Efficient synthesis and photodynamic activity of porphyrin-saccharide conjugates: targeting and incapacitating cancer cells. *Biochemistry* 2004; 43: 10918-29.

201 Driaf K, Krausz P, Verneuil B, Spiro M, Blais JC, Bolbach G. Glycosylated cationic porphyrins as potential agents in cancer phototherapy. *Tetrahedron Letters* 1993; 34: 1027-30.

202 Driaf K, Granet R, Krausz P *et al.* Synthesis of glycosylated cationic porphyrins as potential agents in photodynamic therapy. *Can J Chem* 1996; 74: 1550-63.

203 Sylvain I, Benhaddou R, Carré V *et al.* Synthesis and biological evaluation of thio-glycosylated meso-aryl-porphyrin. *J Porphyrins Phthalocyanines* 1999; 3: 1-4.

204 Schell C, Hombrecher HK. Synthesis and investigation of glycosylated mono- and diarylporphyrins for photodynamic therapy. *Bioorg Med Chem* 1999; 7: 1857-65.

205 Zheng G, Graham A, Shibata M *et al.* Synthesis of beta-galactose-conjugated chlorins derived by enyne metathesis as galectin-specific photosensitizers for photodynamic therapy. *J Org Chem* 2001; 66: 8709-16.

206 Laville I, Figueiredo T, Loock B *et al.* Synthesis, cellular internalization and photodynamic activity of glucoconjugated derivatives of tri and tetra(meta-hydroxyphenyl)chlorins. *Bioorg Med Chem* 2003; 11: 1643-52.

207 Laville I, Pigaglio S, Blais JC *et al.* Photodynamic efficiency of diethylene glycol-linked glycoconjugated porphyrins in human retinoblastoma cells. *J Med Chem* 2006; 49: 2558-67.

208 Di Stasio B, Frochot C, Dumas D *et al.* The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. *Eur J Med Chem* 2005; 40: 1111-22.

209 Monsigny M, Roche AC, Kieda C *et al.* Characterization and biological implications of membrane lectins in tumor, lymphoid and myeloid cells. *Biochimie* 1988; 70: 1633-49.

210 Arap W, Pasqualini R, Ruoslahti E. Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model. *Science* 1998; 279: 377-80.

211 Quemener V, Moulinoux JP, Havouis R *et al.* Polyamine deprivation enhances antitumoral efficacy of chemotherapy. *Anticancer Res* 1992; 12: 1447-53.

212 Zhang GD, Harada A, Nishiyama N *et al.* Polyion complex micelles entrapping cationic dendrimer porphyrin: effective photosensitizer for photodynamic therapy of cancer. *J Control Release* 2003; 93: 141-50.

213 Reddy GR, Bhojani MS, McConville P *et al.* Vascular targeted nanoparticles for imaging and treatment of brain tumors. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 6677-86.

214 Head CS, Luu Q, Sercarz J *et al.* Photodynamic therapy and tumor imaging of hypericin-treated squamous cell carcinoma. *World J Surg Oncol* 2006; 4: 87.

215 Kacerovska D, Pizinger K, Majer F *et al.* Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical hypericum perforatum extract--a pilot study. *Photochem Photobiol* 2008; 84: 779-85.

216 Dougherty TJ, Marcus SL. Photodynamic therapy. *Eur J Cancer* 1992; 28A: 1734-42.

217 Nseyo UO, DeHaven J, Dougherty TJ *et al.* Photodynamic therapy (PDT) in the treatment of patients with resistant superficial bladder cancer: a long-term experience. *J Clin Laser Med Surg* 1998; 16: 61-8.

218 Vaucher L, Jichlinski P, Lange N *et al.* Hexyl-aminolevulinate-mediated photodynamic therapy: how to spare normal urothelium. An in vitro approach. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 67-75.

219 Usuda J, Kato H, Okunaka T *et al.* Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers. *J Thorac Oncol* 2006; 1: 489-93.

220 Edell ES, Cortese DA. Photodynamic therapy in the management of early superficial squamous cell carcinoma as an alternative to surgical resection. *Chest* 1992; 102: 1319-22.

221 Furuse K, Fukuoka M, Kato H *et al.* A prospective phase II study on photodynamic therapy with photofrin II for centrally located early-stage lung cancer. The Japan Lung Cancer Photodynamic Therapy Study Group. *J Clin Oncol* 1993; 11: 1852-7.

222 Loewen GM, Pandey R, Bellnier D *et al.* Endobronchial photodynamic therapy for lung cancer. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 364-70.

223 Chen M, Pennathur A, Luketich JD. Role of photodynamic therapy in unresectable esophageal and lung cancer. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 396-402.

224 Corti L, Toniolo L, Boso C *et al.* Long-term survival of patients treated with photodynamic therapy for carcinoma in situ and early non-small-cell lung carcinoma. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 394-402.

225 Ris HB, Im Hof V, Stewart CM *et al.* Endobronchial photodynamic therapy: comparison of mTHPC and polyethylene glycol-derived mTHPC on human tumor xenografts and tumor-free bronchi of minipigs. *Lasers Surg Med* 1998; 23: 25-32.

226 Overholt BF, Panjehpour M. Photodynamic therapy for Barrett's esophagus. *Gastrointest Endosc Clin N Am* 1997; 7: 207-20.

227 Cameron AJ, Ott BJ, Payne WS. The incidence of adenocarcinoma in columnar-lined (Barrett's) esophagus. *N Engl J Med* 1985; 313: 857-9.

228 Overholt BF, Panjehpour M, Halberg DL. Photodynamic therapy for Barrett's esophagus with dysplasia and/or early stage carcinoma: long-term results. *Gastrointest Endosc* 2003; 58: 183-8.

229 Biel M. Advances in photodynamic therapy for the treatment of head and neck cancers. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 349-55.

230 Muller PJ, Wilson BC. Photodynamic therapy for recurrent supratentorial gliomas. *Semin Surg Oncol* 1995; 11: 346-54.

231 Stylli SS, Kaye AH. Photodynamic therapy of cerebral glioma - a review. Part II - clinical studies. *J Clin Neurosci* 2006; 13: 709-17.

232 Stylli SS, Kaye AH. Photodynamic therapy of cerebral glioma--a review Part I--a biological basis. *J Clin Neurosci* 2006; 13: 615-25.

233 Beck TJ, Kreth FW, Beyer W *et al.* Interstitial photodynamic therapy of nonresectable malignant glioma recurrences using 5-aminolevulinic acid induced protoporphyrin IX. *Lasers Surg Med* 2007; 39: 386-93.

234 Mathews MS, Angell-Petersen E, Sanchez R *et al.* The effects of ultra low fluence rate single and repetitive photodynamic therapy on glioma spheroids. *Lasers Surg Med* 2009; 41: 578-84.

235 DeLaney TF, Sindelar WF, Tochner Z *et al.* Phase I study of debulking surgery and photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1993; 25: 445-57.

236 Cengel KA, Glatstein E, Hahn SM. Intraperitoneal photodynamic therapy. *Cancer Treat Res* 2007; 134: 493-514.

237 Ascencio M, Collinet P, Farine MO *et al.* Protoporphyrin IX fluorescence photobleaching is a useful tool to predict the response of rat ovarian cancer following hexaminolevulinate photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 2008; 40: 332-41.

238 Zoepf T, Jakobs R, Arnold JC *et al.* Photodynamic therapy for palliation of nonresectable bile duct cancer--preliminary results with a new diode laser system. *Am J Gastroenterol* 2001; 96: 2093-7.

239 Trachtenberg J, Bogaards A, Weersink RA *et al.* Vascular targeted photodynamic therapy with palladium-bacteriopheophorbide photosensitizer for recurrent prostate cancer following definitive radiation therapy: assessment of safety and treatment response. *J Urol* 2007; 178: 1974-9; discussion 9.

240 Eggener SE, Scardino PT, Carroll PR *et al.* Focal therapy for localized prostate cancer: a critical appraisal of rationale and modalities. *J Urol* 2007; 178: 2260-7.

241 Moore CM, Nathan TR, Lees WR *et al.* Photodynamic therapy using meso tetra hydroxy phenyl chlorin (mTHPC) in early prostate cancer. *Lasers Surg Med* 2006; 38: 356-63.

242 Na R, Stender IM, Wulf HC. Can autofluorescence demarcate basal cell carcinoma from normal skin? A comparison with protoporphyrin IX fluorescence. *Acta Derm Venereol* 2001; 81: 246-9.

243 Fritsch C, Becker-Wegerich PM, Menke H *et al.* Successful surgery of multiple recurrent basal cell carcinomas guided by photodynamic diagnosis. *Aesthetic Plast Surg* 1997; 21: 437-9.

244 Jones CM, Mang T, Cooper M *et al.* Photodynamic therapy in the treatment of Bowen's disease. *J Am Acad Dermatol* 1992; 27: 979-82.

245 Carruth JA, McKenzie AL. Preliminary report of a pilot study of photoradiation therapy for the treatment of superficial malignancies of the skin, head and neck. *Eur J Surg Oncol* 1985; 11: 47-50.

246 Dougherty TJ, Kaufman JE, Goldfarb A *et al.* Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 1978; 38: 2628-35.

247 Bandieramonte G, Marchesini R, Melloni E *et al.* Laser phototherapy following HpD administration in superficial neoplastic lesions. *Tumori* 1984; 70: 327-34.

248 Wilson BD, Mang TS, Stoll H *et al.* Photodynamic therapy for the treatment of basal cell carcinoma. *Arch Dermatol* 1992; 128: 1597-601.

249 Gayl Schweitzer V. Photofrin-mediated photodynamic therapy for treatment of aggressive head and neck nonmelanomatous skin tumors in elderly patients. *Laryngoscope* 2001; 111: 1091-8.

250 Waldow SM, Lobraico RV, Kohler IK *et al.* Photodynamic therapy for treatment of malignant cutaneous lesions. *Lasers Surg Med* 1987; 7: 451-6.

251 Wooten RS, Smith KC, Ahlquist DA *et al.* Prospective study of cutaneous phototoxicity after systemic hematoporphyrin derivative. *Lasers Surg Med* 1988; 8: 294-300.

252 Zeitouni NC, Oseroff AR, Shieh S. Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancers. Current review and update. *Mol Immunol* 2003; 39: 1133-6.

253 Kaviani A, Ataie-Fashtami L, Fateh M *et al.* Photodynamic therapy of head and neck basal cell carcinoma according to different clinicopathologic features. *Lasers Surg Med* 2005; 36: 377-82.

254 Koderhold G, Jindra R, Koren H *et al.* Experiences of photodynamic therapy in dermatology. *J Photochem Photobiol B* 1996; 36: 221-3.

255 Kubler AC, Haase T, Staff C *et al.* Photodynamic therapy of primary nonmelanomatous skin tumours of the head and neck. *Lasers Surg Med* 1999; 25: 60-8.

256 Betz CS, Rauschning W, Stranadko EP *et al.* Optimization of treatment parameters for Foscan-PDT of basal cell carcinomas. *Lasers Surg Med* 2008; 40: 300-11.

257 Marcus J, Glassberg E, Dimino-Emme L *et al.* Photodynamic therapy for the treatment of squamous cell carcinoma using benzoporphyrin derivative. *J Dermatol Surg Oncol* 1994; 20: 375-82.

258 Middelkamp-Hup MA, Sanchez-Carpintero I, Kossodo S *et al.* Photodynamic therapy for cutaneous proliferative vascular tumors in a mouse model. *J Invest Dermatol* 2003; 121: 634-9.

259 Lui H, Hobbs L, Tope WD *et al.* Photodynamic therapy of multiple nonmelanoma skin cancers with verteporfin and red light-emitting diodes: two-year results evaluating tumor response and cosmetic outcomes. *Arch Dermatol* 2004; 140: 26-32.

260 Gibson KD, Neuberger A, Scott JJ. The purification and properties of delta-aminolaevulic acid dehydrase. *Biochem J* 1955; 61: 618-29.

261 Jarrett A, Rimington C, Willoughby DA. Delta-Aminolaevulic acid and porphyria. *Lancet* 1956; 270: 125-7.

262 Berlin NI, Neuberger A, Scott JJ. The metabolism of delta -aminolaevulic acid. 2. Normal pathways, studied with the aid of 14C. *Biochem J* 1956; 64: 90-100.

263 Berlin NI, Neuberger A, Scott JJ. The metabolism of delta -aminolaevulic acid. 1. Normal pathways, studied with the aid of 15N. *Biochem J* 1956; 64: 80-90.

264 Kalka K, Merk H, Mukhtar H. Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol* 2000; 42: 389-413; quiz 4-6.

265 Morton CA, MacKie RM, Whitehurst C *et al.* Photodynamic therapy for basal cell carcinoma: effect of tumor thickness and duration of photosensitizer application on response. *Arch Dermatol* 1998; 134: 248-9.

266 Fink-Puches R, Wolf P, Kerl H. Photodynamic therapy of superficial basal cell carcinoma by instillation of aminolevulinic acid and irradiation with visible light. *Arch Dermatol* 1997; 133: 1494-5.

267 Morton CA, Whitehurst C, Moseley H *et al.* Comparison of photodynamic therapy with cryotherapy in the treatment of Bowen's disease. *Br J Dermatol* 1996; 135: 766-71.

268 Morton C, Campbell S, Gupta G *et al.* Intraindividual, right-left comparison of topical methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy and cryotherapy in subjects with actinic keratoses: a multicentre, randomized controlled study. *Br J Dermatol* 2006; 155: 1029-36.

269 Lehmann P. Methyl aminolaevulinate-photodynamic therapy: a review of clinical trials in the treatment of actinic keratoses and nonmelanoma skin cancer. *Br J Dermatol* 2007; 156: 793-801.

270 Szeimies RM, Karrer S, Radakovic-Fijan S *et al.* Photodynamic therapy using topical methyl 5-aminolevulinate compared with cryotherapy for actinic keratosis: A prospective, randomized study. *J Am Acad Dermatol* 2002; 47: 258-62.

271 Freeman M, Vinciullo C, Francis D *et al.* A comparison of photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate (Metvix) with single cycle cryotherapy in patients with actinic keratosis: a prospective, randomized study. *J Dermatolog Treat* 2003; 14: 99-106.

272 Pariser DM, Lowe NJ, Stewart DM *et al.* Photodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: results of a prospective randomized multicenter trial. *J Am Acad Dermatol* 2003; 48: 227-32.

273 Wulf HC, Pavel S, Stender I *et al.* Topical photodynamic therapy for prevention of new skin lesions in renal transplant recipients. *Acta Derm Venereol* 2006; 86: 25-8.

274 Perrett CM, McGregor JM, Warwick J *et al.* Treatment of post-transplant premalignant skin disease: a randomized intrapatient comparative study of 5-fluorouracil cream and topical photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 2007; 156: 320-8.

275 Berking C, Herzinger T, Flaig MJ *et al.* The efficacy of photodynamic therapy in actinic cheilitis of the lower lip: a prospective study of 15 patients. *Dermatol Surg* 2007; 33: 825-30.

276 Morton C, Horn M, Leman J *et al.* Comparison of topical methyl aminolevulinate photodynamic therapy with cryotherapy or Fluorouracil for treatment of squamous cell carcinoma in situ: Results of a multicenter randomized trial. *Arch Dermatol* 2006; 142: 729-35.

277 Santoro O, Bandieramonte G, Melloni E *et al.* Photodynamic therapy by topical meso-tetraphenylporphinesulfonate tetrasodium salt administration in superficial basal cell carcinomas. *Cancer Res* 1990; 50: 4501-3.

278 Gupta G, Morton CA, Whitehurst C *et al.* Photodynamic therapy with meso-tetra(hydroxyphenyl) chlorin in the topical treatment of Bowen's disease and basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 1999; 141: 385-6.

279 Soler AM, Warloe T, Tausjo J *et al.* Photodynamic therapy by topical aminolevulinic acid, dimethylsulphoxide and curettage in nodular basal cell carcinoma: a one-year follow-up study. *Acta Derm Venereol* 1999; 79: 204-6.

280 Wang I, Bendsoe N, Klinteberg CA *et al.* Photodynamic therapy vs. cryosurgery of basal cell carcinomas: results of a phase III clinical trial. *Br J Dermatol* 2001; 144: 832-40.

281 Choudry K, Brooke RC, Farrar W *et al.* The effect of an iron chelating agent on protoporphyrin IX levels and phototoxicity in topical 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy. *Br J Dermatol* 2003; 149: 124-30.

282 Fijan S, Honigsmann H, Ortel B. Photodynamic therapy of epithelial skin tumours using delta-aminolaevulinic acid and desferrioxamine. *Br J Dermatol* 1995; 133: 282-8.

283 Karrer S, Abels C, Szeimies RM *et al.* Topical application of a first porphycene dye for photodynamic therapy--penetration studies in human perilesional skin and basal cell carcinoma. *Arch Dermatol Res* 1997; 289: 132-7.

284 MacKie RM, Hauschild A, Eggermont AM. Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Ann Oncol* 2009; 20 vi1-7.

285 Grange F. Epidemiologie du mélanome cutané: données descriptives en France et en Europe. *Ann Dermatol Venereol* 2005; 132: 975-82.

286 Souques M. Probabilité de développer un mélanome sur l'ensemble d'une vie en Ile-de-France en 1994. *Ann Dermatol Venereol* 1999; 126: 327-30.

287 Lindholm C, Andersson R, Dufmats M *et al.* Invasive cutaneous malignant melanoma in Sweden, 1990-1999. A prospective, population-based study of survival and prognostic factors. *Cancer* 2004; 101: 2067-78.

288 de Vries E, Boniol M, Dore JF *et al.* Lower incidence rates but thicker melanomas in Eastern Europe before 1992: a comparison with Western Europe. *Eur J Cancer* 2004; 40: 1045-52.

289 Tucker MA, Goldstein AM. Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 2003; 22: 3042-52.

290 Meyle KD, Guldberg P. Genetic risk factors for melanoma. *Hum Genet* 2009; 126: 499-510.

291 Marquette A, Bagot M, Bensussan A *et al.* Recent discoveries in the genetics of melanoma and their therapeutic implications. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2007; 55: 363-72.

292 Soufir N, Ollivaud L, Bertrand G *et al.* A French CDK4-positive melanoma family with a co-inherited EDNRB mutation. *J Dermatol Sci* 2007; 46: 61-4.

293 Raimondi S, Sera F, Gandini S *et al.* MC1R variants, melanoma and red hair color phenotype: a meta-analysis. *Int J Cancer* 2008; 122: 2753-60.

294 Gudbjartsson DF, Sulem P, Stacey SN *et al.* ASIP and TYR pigmentation variants associate with cutaneous melanoma and basal cell carcinoma. *Nat Genet* 2008; 40: 886-91.

295 Saiag P, Bosquet L, Guillot B *et al.* Management of adult patients with cutaneous melanoma without distant metastasis. 2005 update of the French Standards, Options and Recommendations guidelines. Summary report. *Eur J Dermatol* 2007; 17: 325-31.

296 Negrier S, Saiag P, Guillot B *et al.* Recommandations pour la pratique clinique: mise à jour 2005 des recommandations pour la prise en charge des patients adultes atteints d'un mélanome cutané sans métastases à distance (rapport abrégé). *Bull Cancer* 2006; 93: 371-84.

297 Kirkwood JM, Tarhini AA, Moschos SJ *et al.* Adjuvant therapy with high-dose interferon alpha 2b in patients with high-risk stage IIB/III melanoma. *Nat Clin Pract Oncol* 2008; 5: 2-3.

298 Kirkwood JM, Tarhini AA, Panelli MC *et al.* Next generation of immunotherapy for melanoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 3445-55.

299 Korn EL, Liu PY, Lee SJ *et al.* Meta-analysis of phase II cooperative group trials in metastatic stage IV melanoma to determine progression-free and overall survival benchmarks for future phase II trials. *J Clin Oncol* 2008; 26: 527-34.

300 Tsao H, Atkins MB, Sober AJ. Management of cutaneous melanoma. *N Engl J Med* 2004; 351: 998-1012.

301 Balch CM, Buzaid AC, Soong SJ *et al.* Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J Clin Oncol* 2001; 19: 3635-48.

302 Meyer T, Merkel S, Goehl J *et al.* Surgical therapy for distant metastases of malignant melanoma. *Cancer* 2000; 89: 1983-91.

303 Ollila DW, Hsueh EC, Stern SL *et al.* Metastasectomy for recurrent stage IV melanoma. *J Surg Oncol* 1999; 71: 209-13.

304 Mosca PJ, Teicher E, Nair SP *et al.* Can surgeons improve survival in stage IV melanoma? *J Surg Oncol* 2008; 97: 462-8.

305 Bajetta E, Del Vecchio M, Bernard-Marty C *et al.* Metastatic melanoma: chemotherapy. *Semin Oncol* 2002; 29: 427-45.

306 Jacquillat C, Khayat D, Banzet P *et al.* Final report of the French multicenter phase II study of the nitrosourea fotemustine in 153 evaluable patients with disseminated malignant melanoma including patients with cerebral metastases. *Cancer* 1990; 66: 1873-8.

307 Bafaloukos D, Tsoutsos D, Fountzilas G *et al.* The effect of temozolomide-based chemotherapy in patients with cerebral metastases from melanoma. *Melanoma Res* 2004; 14: 289-94.

308 Gogas H, Bafaloukos D, Bedikian AY. The role of taxanes in the treatment of metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2004; 14: 415-20.

309 Glover D, Ibrahim J, Kirkwood J *et al.* Phase II randomized trial of cisplatin and WR-2721 versus cisplatin alone for metastatic melanoma: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E1686). *Melanoma Res* 2003; 13: 619-26.

310 Chapman PB, Einhorn LH, Meyers ML *et al.* Phase III multicenter randomized trial of the Dartmouth regimen versus dacarbazine in patients with metastatic melanoma. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2745-51.

311 Atallah E, Flaherty L. Treatment of metastatic malignant melanoma. *Curr Treat Options Oncol* 2005; 6: 185-93.

312 Petrella T, Quirt I, Verma S *et al.* Single-agent interleukin-2 in the treatment of metastatic melanoma. *Curr Oncol* 2007; 14: 21-6.

313 Legha SS. The role of interferon alfa in the treatment of metastatic melanoma. *Semin Oncol* 1997; 24: S24-31.

314 Barranco SC, Romsdahl MM, Humphrey RM. The radiation response of human malignant melanoma cells grown in vitro. *Cancer Res* 1971; 31: 830-3.

315 Ridolfi L, Ridolfi R, Riccobon A *et al.* Adjuvant immunotherapy with tumor infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in patients with resected stage III and IV melanoma. *J Immunother* 2003; 26: 156-62.

316 Khammari A, Nguyen JM, Pandolfino MC *et al.* Long-term follow-up of patients treated by adoptive transfer of melanoma tumor-infiltrating lymphocytes as adjuvant therapy for stage III melanoma. *Cancer Immunol Immunother* 2007; 56: 1853-60.

317 Robert C, Ghiringhelli F. What is the role of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma? *Oncologist* 2009; 14: 848-61.

318 Hodi FS, Friedlander P, Corless CL *et al.* Major response to imatinib mesylate in KIT-mutated melanoma. *J Clin Oncol* 2008; 26: 2046-51.

319 Lens MB, Dawes M. Isolated limb perfusion with melphalan in the treatment of malignant melanoma of the extremities: a systematic review of randomised controlled trials. *Lancet Oncol* 2003; 4: 359-64.

320 Hayes AJ, Clark MA, Harries M *et al.* Management of in-transit metastases from cutaneous malignant melanoma. *Br J Surg* 2004; 91: 673-82.

321 Radny P, Caroli UM, Bauer J *et al.* Phase II trial of intralesional therapy with interleukin-2 in soft-tissue melanoma metastases. *Br J Cancer* 2003; 89: 1620-6.

322 Atkins MB, Lotze MT, Dutcher JP *et al.* High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma: analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993. *J Clin Oncol* 1999; 17: 2105-16.

323 Koops HS, Vaglini M, Suciu S *et al.* Prophylactic isolated limb perfusion for localized, high-risk limb melanoma: results of a multicenter randomized phase III trial. European Organization for Research and Treatment of Cancer Malignant Melanoma Cooperative Group Protocol 18832, the World Health Organization Melanoma Program Trial 15, and the North American Perfusion Group Southwest Oncology Group-8593. *J Clin Oncol* 1998; 16: 2906-12.

324 Gehl J, Geertsen PF. Efficient palliation of haemorrhaging malignant melanoma skin metastases by electrochemotherapy. *Melanoma Res* 2000; 10: 585-9.

325 Byrne CM, Thompson JF, Johnston H *et al.* Treatment of metastatic melanoma using electroporation therapy with bleomycin (electrochemotherapy). *Melanoma Res* 2005; 15: 45-51.

326 Morton DL, Eilber FR, Holmes EC *et al.* BCG immunotherapy of malignant melanoma: summary of a seven-year experience. *Ann Surg* 1974; 180: 635-43.

327 Nelson JS, McCullough JL, Berns MW. Photodynamic therapy of human malignant melanoma xenografts in athymic nude mice. *J Natl Cancer Inst* 1988; 80: 56-60.

328 Bernstein EF, Thomas GF, Smith PD *et al.* Response of black and white guinea pig skin to photodynamic treatment using 514-nm light and dihematoporphyrin ether. *Arch Dermatol* 1990; 126: 1303-7.

329 Moore JV, Keene JP, Land EJ. Dose-response relationships for photodynamic injury to murine skin. *Br J Radiol* 1986; 59: 257-61.

330 Biolo R, Jori G, Soncin M *et al.* Effect of photosensitizer delivery system and irradiation parameters on the efficiency of photodynamic therapy of B16 pigmented melanoma in mice. *Photochem Photobiol* 1996; 63: 224-8.

331 Zilberstein J, Schreiber S, Bloemers MC *et al.* Antivascular treatment of solid melanoma tumors with bacteriochlorophyll-serine-based photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2001; 73: 257-66.

332 Gomer CJ, Jester JV, Razum NJ *et al.* Photodynamic therapy of intraocular tumors: examination of hematoporphyrin derivative distribution and long-term damage in rabbit ocular tissue. *Cancer Res* 1985; 45: 3718-25.

333 Zilberstein J, Bromberg A, Frantz A *et al.* Light-dependent oxygen consumption in bacteriochlorophyll-serine-treated melanoma tumors: on-line determination using a tissue-inserted oxygen microsensor. *Photochem Photobiol* 1997; 65: 1012-9.

334 Haddad R, Blumenfeld A, Siegal A *et al.* In vitro and in vivo effects of photodynamic therapy on murine malignant melanoma. *Ann Surg Oncol* 1998; 5: 241-7.

335 Biolo R, Jori G, Soncin M *et al.* Photodynamic therapy of B16 pigmented melanoma with liposome-delivered Si(IV)-naphthalocyanine. *Photochem Photobiol* 1994; 59: 362-5.

336 Michailov N, Peeva M, Angelov I *et al.* Fluence rate effects on photodynamic therapy of B16 pigmented melanoma. *J Photochem Photobiol B* 1997; 37: 154-7.

337 Kinsey JH, Cortese DA, Neel HB. Thermal considerations in murine tumor killing using hematoporphyrin derivative phototherapy. *Cancer Res* 1983; 43: 1562-7.

338 Bruce RA, Jr. Evaluation of hematoporphyrin photoradiation therapy to treat choroidal melanomas. *Lasers Surg Med* 1984; 4: 59-64.

339 Tse DT, Dutton JJ, Weingeist TA *et al.* Hematoporphyrin photoradiation therapy for intraocular and orbital malignant melanoma. *Arch Ophthalmol* 1984; 102: 833-8.

340 Panagopoulos JA, Svitra PP, Puliafito CA *et al.* Photodynamic therapy for experimental intraocular melanoma using chloroaluminum sulfonated phthalocyanine. *Arch Ophthalmol* 1989; 107: 886-90.

341 Ozler SA, Nelson JS, Liggett PE *et al.* Photodynamic therapy of experimental subchoroidal melanoma using chloroaluminum sulfonated phthalocyanine. *Arch Ophthalmol* 1992; 110: 555-61.

342 Schmidt-Erfurth U, Bauman W, Gragoudas E *et al.* Photodynamic therapy of experimental choroidal melanoma using lipoprotein-delivered benzoporphyrin. *Ophthalmology* 1994; 101: 89-99.

343 Young LH, Howard MA, Hu LK *et al.* Photodynamic therapy of pigmented choroidal melanomas using a liposomal preparation of benzoporphyrin derivative. *Arch Ophthalmol* 1996; 114: 186-92.

344 Richter AM, Kelly B, Chow J *et al.* Preliminary studies on a more effective phototoxic agent than hematoporphyrin. *J Natl Cancer Inst* 1987; 79: 1327-32.

345 Richter AM, Cerruti-Sola S, Sternberg ED *et al.* Biodistribution of tritiated benzoporphyrin derivative (3H-BPD-MA), a new potent photosensitizer, in normal and tumor-bearing mice. *J Photochem Photobiol B* 1990; 5: 231-44.

346 Busetti A, Soncin M, Jori G *et al.* High efficiency of benzoporphyrin derivative in the photodynamic therapy of pigmented malignant melanoma. *Br J Cancer* 1999; 79: 821-4.

347 Urbanska K, Romanowska-Dixon B, Matuszak Z *et al.* Indocyanine green as a prospective sensitizer for photodynamic therapy of melanomas. *Acta Biochim Pol* 2002; 49: 387-91.

348 Szurko A, Kramer-Marek G, Widel M *et al.* Photodynamic effects of two water soluble porphyrins evaluated on human malignant melanoma cells in vitro. *Acta Biochim Pol* 2003; 50: 1165-74.

349 Nagata S, Obana A, Gohto Y *et al.* Necrotic and apoptotic cell death of human malignant melanoma cells following photodynamic therapy using an amphiphilic photosensitizer, ATX-S10(Na). *Lasers Surg Med* 2003; 33: 64-70.

350 Juzenas P, Juzeniene A, Stakland S *et al.* Photosensitizing effect of protoporphyrin IX in pigmented melanoma of mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 297: 468-72.

351 Pahernik S, Langer S, Botzlar A *et al.* Tissue distribution and penetration of 5-ALA induced fluorescence in an amelanotic melanoma after topical application. *Anticancer Res* 2001; 21: 59-63.

352 Abels C, Szeimies RM, Steinbach P *et al.* Targeting of the tumor microcirculation by photodynamic therapy with a synthetic porphycene. *J Photochem Photobiol B* 1997; 40: 305-12.

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

354 Cordoba F, Braathen LR, Weissenberger J *et al.* 5-aminolaevulinic acid photodynamic therapy in a transgenic mouse model of skin melanoma. *Exp Dermatol* 2005; 14: 429-37.

355 Biel MA. Photodynamic therapy and the treatment of head and neck cancers. *J Clin Laser Med Surg* 1996; 14: 239-44.

356 Feyh J. Photodynamic treatment for cancers of the head and neck. *J Photochem Photobiol B* 1996; 36: 175-7.

357 Favilla I, Barry WR, Gosbell A *et al.* Phototherapy of posterior uveal melanomas. *Br J Ophthalmol* 1991; 75: 718-21.

358 Favilla I, Favilla ML, Gosbell AD *et al.* Photodynamic therapy: a 5-year study of its effectiveness in the treatment of posterior uveal melanoma, and evaluation of haematoporphyrin uptake and photocytotoxicity of melanoma cells in tissue culture. *Melanoma Res* 1995; 5: 355-64.

359 Pass HI. Photodynamic therapy in oncology: mechanisms and clinical. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85: 443-56.

360 Sheleg SV, Zhavrid EA, Khodina TV *et al.* Photodynamic therapy with chlorin e(6) for skin metastases of melanoma. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2004; 20: 21-6.

361 Zilidis G, Aziz F, Telara S *et al.* Fluorescence image-guided surgery and repetitive Photodynamic Therapy in brain metastatic malignant melanoma. *Photodiagnosis Photodyn Ther* 2008; 5: 264-6.

362 Wolf P, Fink-Puches R, Reimann-Weber A *et al.* Development of malignant melanoma after repeated topical photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid at the exposed site. *Dermatology* 1997; 194: 53-4.

363 Roberts JE. Ocular phototoxicity. *J Photochem Photobiol B* 2001; 64: 136-43.

364 Boulton M, Rozanowska M, Rozanowski B. Retinal photodamage. *J Photochem Photobiol B* 2001; 64: 144-61.

365 Levi F, Canon C, Dipalma M *et al.* When should the immune clock be reset? From circadian pharmacodynamics to temporally optimized drug delivery. *Ann N Y Acad Sci* 1991; 618: 312-29.

366 Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. Expression of growth factors in early wound healing in rat skin. *Lasers Surg Med* 1994; 15: 281-9.

367 Yu W, Naim JO, Lanzafame RJ. The effect of laser irradiation on the release of bFGF from 3T3 fibroblasts. *Photochem Photobiol* 1994; 59: 167-70.

368 Dillon J, Zheng L, Merriam JC *et al.* Transmission of light to the aging human retina: possible implications for age related macular degeneration. *Exp Eye Res* 2004; 79: 753-9.

369 Meyers SM, Ostrovsky MA, Bonner RF. A model of spectral filtering to reduce photochemical damage in age-related macular degeneration. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2004; 102: 83-93; discussion -5.

370 Sparrow JR, Miller AS, Zhou J. Blue light-absorbing intraocular lens and retinal pigment epithelium protection in vitro. *J Cataract Refract Surg* 2004; 30: 873-8.

371 Setlow RB. Spectral regions contributing to melanoma: a personal view. *J Investig Dermatol Symp Proc* 1999; 4: 46-9.

372 Brainard GC, Hanifin JP, Greeson JM *et al.* Action spectrum for melatonin regulation in humans: evidence for a novel circadian photoreceptor. *J Neurosci* 2001; 21: 6405-12.

373 Akaraphanth R, Kanjanawanitchkul W, Gritiyarangsan P. Efficacy of ALA-PDT vs blue light in the treatment of acne. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2007; 23: 186-90.

374 Papageorgiou P, Katsambas A, Chu A. Phototherapy with blue (415 nm) and red (660 nm) light in the treatment of acne vulgaris. *Br J Dermatol* 2000; 142: 973-8.

375 Sigurdsson V, Knulst AC, van Weelden H. Phototherapy of acne vulgaris with visible light. *Dermatology* 1997; 194: 256-60.

376 Itkin A, Gilchrest BA. delta-Aminolevulinic acid and blue light photodynamic therapy for treatment of multiple basal cell carcinomas in two patients with nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dermatol Surg* 2004; 30: 1054-61.

377 Youl P, Aitken J, Hayward N *et al.* Melanoma in adolescents: a case-control study of risk factors in Queensland, Australia. *Int J Cancer* 2002; 98: 92-8.

378 Gallagher RP, McLean DI, Yang CP *et al.* Suntan, sunburn, and pigmentation factors and the frequency of acquired melanocytic nevi in children. Similarities to melanoma: the Vancouver Mole Study. *Arch Dermatol* 1990; 126: 770-6.

379 Grulich AE, Bataille V, Swerdlow AJ *et al.* Naevi and pigmentary characteristics as risk factors for melanoma in a high-risk population: a case-control study in New South Wales, Australia. *Int J Cancer* 1996; 67: 485-91.

380 McDonagh AF, Palma LA, Lightner DA. Blue light and bilirubin excretion. *Science* 1980; 208: 145-51.

381 Seidman DS, Moise J, Ergaz Z *et al.* A new blue light-emitting phototherapy device: a prospective randomized controlled study. *J Pediatr* 2000; 136: 771-4.

382 Dennery PA, Seidman DS, Stevenson DK. Neonatal hyperbilirubinemia. *N Engl J Med* 2001; 344: 581-90.

383 Tan KL. Phototherapy for neonatal jaundice. *Clin Perinatol* 1991; 18: 423-39.

384 Csoma Z, Hencz P, Orvos H *et al.* Neonatal blue-light phototherapy could increase the risk of dysplastic nevus development. *Pediatrics* 2007; 119: 1269.

385 Gandini S, Sera F, Cattaruzza MS *et al.* Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer* 2005; 41: 28-44.

386 Matichard E, Le Henanff A, Sanders A *et al.* Effect of neonatal phototherapy on melanocytic nevus count in children. *Arch Dermatol* 2006; 142: 1599-604.

387 Bauer J BP, Luther H, Wiecher TS, Mohrle M, Garbe C. Blue light phototherapy of neonatal jaundice does not increase the risk for melanocytic nevus development. *Arch Dermatol* 2004; 140: 493.

388 Berg P, Lindelof B. Is phototherapy in neonates a risk factor for malignant melanoma development? *Arch Pediatr Adolesc Med* 1997; 151: 1185-7.

389 Mahe E, Beauchet A, Aegerter P *et al.* Neonatal blue-light phototherapy does not increase nevus count in 9-year-old children. *Pediatrics* 2009; 123: e896-900.

390 Zigman S. Lens UVA photobiology. *J Ocul Pharmacol Ther* 2000; 16: 161-5.

391 Slominski A, Pawelek J. Animals under the sun: effects of ultraviolet radiation on mammalian skin. *Clin Dermatol* 1998; 16: 503-15.

392 Legrand-Poels S, Schoonbroodt S, Matroule JY *et al.* Nf-kappa B: an important transcription factor in photobiology. *J Photochem Photobiol B* 1998; 45: 1-8.

393 Gorgidze LA, Oshemkova SA, Vorobjev IA. Blue light inhibits mitosis in tissue culture cells. *Biosci Rep* 1998; 18: 215-24.

394 Aggarwal BB, Quintanilha AT, Cammack R *et al.* Damage to mitochondrial electron transport and energy coupling by visible light. *Biochim Biophys Acta* 1978; 502: 367-82.

395 Pflaum M, Kielbassa C, Garmyn M *et al.* Oxidative DNA damage induced by visible light in mammalian cells: extent, inhibition by antioxidants and genotoxic effects. *Mutat Res* 1998; 408: 137-46.

396 Wataha JC, Lewis JB, Lockwood PE *et al.* Blue light differentially modulates cell survival and growth. *J Dent Res* 2004; 83: 104-8.

397 Rotenberg S, Lewis JB, Lockwood PE *et al.* Extracellular environment as one mediator of blue light-induced mitochondrial suppression. *Dent Mater* 2006; 22: 759-64.

398 Hockberger PE, Skimina TA, Centonze VE *et al.* Activation of flavin-containing oxidases underlies light-induced production of H2O2 in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 6255-60.

399 Winkler BS, Boulton ME, Gottsch JD *et al.* Oxidative damage and age-related macular degeneration. *Mol Vis* 1999; 5: 32.

400 Beatty S, Koh H, Phil M *et al.* The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2000; 45: 115-34.

401 Lewis JB, Wataha JC, Messer RL *et al.* Blue light differentially alters cellular redox properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2005; 72: 223-9.

402 Delori FC, Goger DG, Dorey CK. Age-related accumulation and spatial distribution of lipofuscin in RPE of normal subjects. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1855-66.

403 Young RW. Solar radiation and age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 1988; 32: 252-69.

404 Sparrow JR, Parish CA, Hashimoto M *et al.* A2E, a lipofuscin fluorophore, in human retinal pigmented epithelial cells in culture. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999; 40: 2988-95.

405 Sparrow JR, Nakanishi K, Parish CA. The lipofuscin fluorophore A2E mediates blue light-induced damage to retinal pigmented epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 1981-9.

406 Sparrow JR, Zhou J, Ben-Shabat S *et al.* Involvement of oxidative mechanisms in blue-light-induced damage to A2E-laden RPE. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 1222-7.

407 Sparrow JR, Fishkin N, Zhou J *et al.* A2E, a byproduct of the visual cycle. *Vision Res* 2003; 43: 2983-90.

408 Schutt F, Davies S, Kopitz J *et al.* Photodamage to human RPE cells by A2-E, a retinoid component of lipofuscin. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000; 41: 2303-8.

409 Sparrow JR, Cai B. Blue light-induced apoptosis of A2E-containing RPE: involvement of caspase-3 and protection by Bcl-2. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001; 42: 1356-62.

410 Wu J, Gorman A, Zhou X *et al.* Involvement of caspase-3 in photoreceptor cell apoptosis induced by in vivo blue light exposure. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002; 43: 3349-54.

411 Bouly JP, Schleicher E, Dionisio-Sese M *et al.* Cryptochrome blue light photoreceptors are activated through interconversion of flavin redox states. *J Biol Chem* 2007; 282: 9383-91.

412 Seagle BL, Rezai KA, Kobori Y *et al.* Melanin photoprotection in the human retinal pigment epithelium and its correlation with light-induced cell apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 8978-83.

413 Demirci H, Shields CL, Shields JA *et al.* Orbital tumors in the older adult population. *Ophthalmology* 2002; 109: 243-8.

414 McLean MJ, Foster WD, Zimmerman LE. Prognostic factors in small malignant melanomas of choroid and ciliary body. *Arch Ophthalmol* 1977; 95: 48-58.

415 Spencer WH. Ophthalmic pathology and the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology* 1996; 103: S109-17.

416 Marshall JC, Gordon KD, McCauley CS *et al.* The effect of blue light exposure and use of intraocular lenses on human uveal melanoma cell lines. *Melanoma Res* 2006; 16: 537-41.

417 Manning WS, Jr., Greenlee PG, Norton JN. Ocular melanoma in a Long Evans rat. *Contemp Top Lab Anim Sci* 2004; 43: 44-6.

418 King A, Gottlieb E, Brooks DG *et al.* Mitochondria-derived reactive oxygen species mediate blue light-induced death of retinal pigment epithelial cells. *Photochem Photobiol* 2004; 79: 470-5.

419 Di Cesare S, Maloney S, Fernandes BF *et al.* The effect of blue light exposure in an ocular melanoma animal model. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28: 48.

420 Sol V, Chaleix V, Champavier Y *et al.* Glycosyl bis-porphyrin conjugates: synthesis and potential application in PDT. *Bioorg Med Chem* 2006; 14: 7745-60.

421 Sol V, Lamarche F, Enache M *et al.* Polyamine conjugates of meso-tritolylporphyrin and protoporphyrin IX: potential agents for photodynamic therapy of cancers. *Bioorg Med Chem* 2006; 14: 1364-77.

422 Garcia G, Sol V, Lamarche F *et al.* Synthesis and photocytotoxic activity of new chlorin-polyamine conjugates. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16: 3188-92.

423 Chaleix V, Sol V, Huang YM *et al.* RGD-Porphyrin conjugates: synthesis and potential application in photodynamic therapy. *Eur j Org Chem* 2003: 1486-93.

424 Merrifield RB. Solid phase synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc* 1963; 85: 2149-54.

425 Kisfaludy L, Nyeki O, Schon I *et al.* Immuno-regulating peptides, I. Synthesis and structure-activity relationships of thymopentin analogs. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1983; 364: 933-40.

426 Castro B, Dormoy, J. R, Evin, G, Selve, C. Réactifs de couplage peptidique I (1)-l'hexafluorophosphate de benzotriazolyl N-oxytrisdimethylaminophosphonium (B.O.P.). *Tetrahedron Letters* 1975; 16: 1219-22.

427 Coste J, Le-Nguyen, D, Castro, B. PyBop: a new peptide coupling reagent devoid of toxic by-product. *Tetrahedron Letters* 1990; 31: 205-8.

428 Reid GE, Simpson RJ. Automated solid-phase peptide synthesis: use of 2-(1H-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate for coupling of tert-butyloxycarbonyl amino acids. *Anal Biochem* 1992; 200: 301-9.

429 Lindsey JS, Hsu H, Schreiman IC. Synthesis of tetraphenylporphyrins under very mild conditions. *Tetrahedron Letters* 1986; 27: 4969-70.

430 Fuhrhop JH, Demoulin C, Boettcher C, Koening J, Siggel U. Chiral micellar porphyrin fibers with 2-aminoglycosamide head groups. *J Am Chem Soc* 1992; 114: 4159-65.

431 Kasha M, Rawls HR, Ashraf El-Bayoumi M. Exciton model in molecular spectroscopy. *Pure Appl Chem* 1965; 11: 371-92.

432 Plow EF, Haas TA, Zhang L *et al.* Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* 2000; 275: 21785-8.

433 Calderwood DA, Shattil SJ, Ginsberg MH. Integrins and actin filaments: reciprocal regulation of cell adhesion and signaling. *J Biol Chem* 2000; 275: 22607-10.

434 van der Flier A, Sonnenberg A. Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* 2001; 305: 285-98.

435 Xiong JP, Stehle T, Zhang R *et al.* Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3 in complex with an Arg-Gly-Asp ligand. *Science* 2002; 296: 151-5.

436 Hood JD, Frausto R, Kiosses WB *et al.* Differential alphav integrin-mediated Ras-ERK signaling during two pathways of angiogenesis. *J Cell Biol* 2003; 162: 933-43.

437 Eliceiri BP, Cheresh DA. The role of alphav integrins during angiogenesis: insights into potential mechanisms of action and clinical development. *J Clin Invest* 1999; 103: 1227-30.

438 Pfaff M, Tangemann K, Muller B *et al.* Selective recognition of cyclic RGD peptides of NMR defined conformation by alpha IIb beta 3, alpha V beta 3, and alpha 5 beta 1 integrins. *J Biol Chem* 1994; 269: 20233-8.

439 Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 619-42.

440 Desagher S, Martinou JC. Mitochondria as the central control point of apoptosis. *Trends Cell Biol* 2000; 10: 369-77.

441 Azzolin L, von Stockum S, Basso E *et al.* The mitochondrial permeability transition from yeast to mammals. *FEBS Lett* 2010; 584.

442 Lartigue L, Medina C, Schembri L *et al.* An intracellular wave of cytochrome c propagates and precedes Bax redistribution during apoptosis. *J Cell Sci* 2008; 121: 3515-23.

443 Nowikovsky K, Schweyen RJ, Bernardi P. Pathophysiology of mitochondrial volume homeostasis: potassium transport and permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787: 345-50.

444 Vermes I, Haanen C, Richel DJ *et al.* Apoptosis and secondary necrosis of lymphocytes in culture. *Acta Haematol* 1997; 98: 8-13.

445 Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998; 281: 1312-6.

446 Couzinet A, Zoltan A, Hueber AO. Régulation de la mort cellulaire programmée: vers une conception plus dynamique. *Med Sci* 2002; 18: 841-52.

447 Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW *et al.* Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 1996; 87: 171.

448 Lippens S, Kockx M, Knaapen M *et al.* Epidermal differentiation does not involve the pro-apoptotic executioner caspases, but is associated with caspase-14 induction and processing. *Cell Death Differ* 2000; 7: 1218-24.

449 Fuentes-Prior P, Salvesen GS. The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 2004; 384: 201-32.

450 Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. *J Cell Physiol* 2002; 192: 131-7.

451 Acehan D, Jiang X, Morgan DG *et al.* Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 2002; 9: 423-32.

452 Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993; 74: 609-19.

453 Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998; 281: 1322-6.

454 Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; 22: 8590-607.

455 Muchmore SW, Sattler M, Liang H *et al.* X-ray and NMR structure of human Bcl-xL, an inhibitor of programmed cell death. *Nature* 1996; 381: 335-41.

456 Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of cell death: processing of apoptosis-inducing factor (AIF). *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 396: 95-100.

457 Galluzzi L, Joza N, Tasdemir E *et al.* No death without life: vital functions of apoptotic effectors. *Cell Death Differ* 2008; 15: 1113-23.

458 Boujrad H, Gubkina O, Robert N *et al.* AIF-mediated programmed necrosis: a highly regulated way to die. *Cell Cycle* 2007; 6: 2612-9.

459 Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N *et al.* Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-6.

460 Martinou JC, Desagher S, Antonsson B. Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing. *Nat Cell Biol* 2000; 2: E41-3.

461 Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001; 2: 67-71.

462 Marzo I, Brenner C, Zamzami N *et al.* Bax and adenine nucleotide translocator cooperate in the mitochondrial control of apoptosis. *Science* 1998; 281: 2027-31.

463 Marzo I, Brenner C, Zamzami N *et al.* The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. *J Exp Med* 1998; 187: 1261-71.

464 Antonsson B, Montessuit S, Sanchez B *et al.* Bax is present as a high molecular weight oligomer/complex in the mitochondrial membrane of apoptotic cells. *J Biol Chem* 2001; 276: 11615-23.

465 Antonsson B, Montessuit S, Lauper S *et al.* Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 2000; 345: 271-8.

466 Ferri KF, Kroemer G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 2001; 3: E255-63.

467 Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002; 2: 420-30.

468 Chaudhary PM, Eby M, Jasmin A *et al.* Death receptor 5, a new member of the TNFR family, and DR4 induce FADD-dependent apoptosis and activate the NF-kappaB pathway. *Immunity* 1997; 7: 821-30.

469 Siegel RM, Chan FK, Chun HJ *et al.* The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nat Immunol* 2000; 1: 469-74.

470 Kischkel FC, Hellbardt S, Behrmann I *et al.* Cytotoxicity-dependent APO-1 (Fas/CD95)-associated proteins form a death-inducing signaling complex (DISC) with the receptor. *EMBO J* 1995; 14: 5579-88.

471 Gupta S. Molaecular signaling in death receptor and mitochondrial pathway of apotosis. *Int J Oncol* 2003; 22: 15-20.

472 Micheau O, Tschopp J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003; 114: 181-90.

473 Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116: 205-19.

474 Nakamura K, Yoshikawa N, Yamaguchi Y *et al.* Characterization of mouse melanoma cell lines by their mortal malignancy using an experimental metastatic model. *Life Sci* 2002; 70: 791-8.

475 Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res* 1975; 35: 218-24.

476 Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55-63.

477 Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci* 2002; 1: 1-21.

478 Schreiber S, Gross S, Brandis A *et al.* Local photodynamic therapy (PDT) of rat C6 glioma xenografts with Pd-bacteriopheophorbide leads to decreased metastases and increase of animal cure compared with surgery. *Int J Cancer* 2002; 99: 279-85.

479 Berns MW, Coffey J, Wile AG. Laser photoradiation therapy of cancer: possible role of hyperthermia. *Lasers Surg Med* 1984; 4: 87-92.

480 Leunig M, Leunig A, Lankes P *et al.* Evaluation of photodynamic therapy-induced heating of hamster melanoma and its effect on local tumour eradication. *Int J Hyperthermia* 1994; 10: 297-306.

481 Russo AR, Mitchell JB, Pass HI, Glatstein EJ. . Photodynamic therapy. *Cancer, Principles and practice of oncology* 1989: 2249-59.

482 Buchanan RB, Carruth JA, McKenzie AL *et al.* Photodynamic therapy in the treatment of malignant tumours of the skin and head and neck. *Eur J Surg Oncol* 1989; 15: 400-6.

483 Zalar GL, Poh-Fitzpatrick M, Krohn DL *et al.* Induction of drug photosensitization in man after parenteral exposure to hematoporphyrin. *Arch Dermatol* 1977; 113: 1392-7.

484 McCullough JL, Weinstein GD, Douglas JL *et al.* Photosensitizers in dermatology. *Photochem Photobiol* 1987; 46: 77-82.

485 Doiron DR. Photophysics of and instrumentation for porphyrin detection and activation. *Prog Clin Biol Res* 1984; 170: 41-73.

486 Christensen T, Smedshammer L, Wahl A *et al.* Photodynamic effects and hyperthermia in vitro. *Adv Exp Med Biol* 1985; 193: 69-78.

487 Ricchelli F, Franchi L, Miotto G *et al.* Meso-substituted tetra-cationic porphyrins photosensitize the death of human fibrosarcoma cells via lysosomal targeting. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; 37: 306-19.

488 Specht KG, Rodgers MA. Depolarization of mouse myeloma cell membranes during photodynamic action. *Photochem Photobiol* 1990; 51: 319-24.

489 van Hillegersberg R, Kort WJ, Wilson JH. Current status of photodynamic therapy in oncology. *Drugs* 1994; 48: 510-27.

490 Short TW, Porst M, Palmer J *et al.* Blue Light Induces Phosphorylation at Seryl Residues on a Pea (Pisum sativum L.) Plasma Membrane Protein. *Plant Physiol* 1994; 104: 1317-24.

491 Godley BF, Shamsi FA, Liang FQ *et al.* Blue light induces mitochondrial DNA damage and free radical production in epithelial cells. *J Biol Chem* 2005; 280: 21061-6.

492 Liebmann J, Born M, Kolb-Bachofen V. Blue-light irradiation regulates proliferation and differentiation in human skin cells. *J Invest Dermatol* 2010; 130: 259-69.

493 Setlow RB, Grist E, Thompson K *et al.* Wavelengths effective in induction of malignant melanoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993; 90: 6666-70.

494 Setlow RB, Woodhead AD. Temporal changes in the incidence of malignant melanoma: explanation from action spectra. *Mutat Res* 1994; 307: 365-74.

495 Wataha JC, Lockwood PE, Lewis JB *et al.* Biological effects of blue light from dental curing units. *Dent Mater* 2004; 20: 150-7.

496 Ohara M, Kawashima Y, Katoh O *et al.* Blue light inhibits the growth of B16 melanoma cells. *Jpn J Cancer Res* 2002; 93: 551-8.

497 Sroka R, Schaffer M, Fuchs C *et al.* Effects on the mitosis of normal and tumor cells induced by light treatment of different wavelengths. *Lasers Surg Med* 1999; 25: 263-71.

498 Ohara M, Fujikura T, Fujiwara H. Augmentation of the inhibitory effect of blue light on the growth of B16 melanoma cells by riboflavin. *Int J Oncol* 2003; 22: 1291-5.

499 Ohara M, Kobayashi M, Fujiwara H *et al.* Blue light inhibits melanin synthesis in B16 melanoma 4A5 cells and skin pigmentation induced by ultraviolet B in guinea-pigs. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2004; 20: 86-92.

500 Ohara M, Kawashima Y, Kitajima S *et al.* Inhibition of lung metastasis of B16 melanoma cells exposed to blue light in mice. *Int J Mol Med* 2002; 10: 701-5.

501 Ma LW, Nielsen KP, Iani V *et al.* A new method for photodynamic therapy of melanotic melanoma - effects of depigmentation with violet light photodynamic therapy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2007; 26: 165-72.

502 Taylor HR, West S, Munoz B *et al.* The long-term effects of visible light on the eye. *Arch Ophthalmol* 1992; 110: 99-104.

503 Thresher RJ, Vitaterna MH, Miyamoto Y *et al.* Role of mouse cryptochrome blue-light photoreceptor in circadian photoresponses. *Science* 1998; 282: 1490-4.

504 Sancar A. Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* 1994; 33: 2-9.

505 Sancar A. Cryptochrome: the second photoactive pigment in the eye and its role in circadian photoreception. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 31-67.

506 Lin C. Plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci* 2000; 5: 337-42.

507 Hsu DS, Zhao X, Zhao S *et al.* Putative human blue-light photoreceptors hCRY1 and hCRY2 are flavoproteins. *Biochemistry* 1996; 35: 13871-7.

508 Kobayashi K, Kanno S, Smit B *et al.* Characterization of photolyase/blue-light receptor homologs in mouse and human cells. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 5086-92.

509 Ahmad M, Cashmore AR. HY4 gene of A. thaliana encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 1993; 366: 162-6.

510 Sancar A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chem Rev* 2003; 103: 2203-37.

511 Todo T. Functional diversity of the DNA photolyase/blue light receptor family. *Mutat Res* 1999; 434: 89-97.

512 Malhotra K, Kim ST, Batschauer A *et al.* Putative blue-light photoreceptors from Arabidopsis thaliana and Sinapis alba with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyase cofactors but lack DNA repair activity. *Biochemistry* 1995; 34: 6892-9.

513 Giovani B, Byrdin M, Ahmad M *et al.* Light-induced electron transfer in a cryptochrome blue-light photoreceptor. *Nat Struct Biol* 2003; 10: 489-90.

514 Khurana JP. Cryptic blues: mechanism in sight! *Cur Sience* 2001; 80: 189-98.

515 Thompson CL, Bowes Rickman C, Shaw SJ *et al.* Expression of the blue-light receptor cryptochrome in the human retina. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003; 44: 4515-21.

516 Ozgur S, Sancar A. Purification and properties of human blue-light photoreceptor cryptochrome 2. *Biochemistry* 2003; 42: 2926-32.

517 Zeke T, Morrice N, Vazquez-Martin C *et al.* Human protein phosphatase 5 dissociates from heat-shock proteins and is proteolytically activated in response to arachidonic acid and the microtubule-depolymerizing drug nocodazole. *Biochem J* 2005; 385: 45-56.

518 Zuo Z, Dean NM, Honkanen RE. Serine/threonine protein phosphatase type 5 acts upstream of p53 to regulate the induction of p21(WAF1/Cip1) and mediate growth arrest. *J Biol Chem* 1998; 273: 12250-8.

519 Zhao S, Sancar A. Human blue-light photoreceptor hCRY2 specifically interacts with protein serine/threonine phosphatase 5 and modulates its activity. *Photochem Photobiol* 1997; 66: 727-31.

520 Ennever JF, McDonagh AF, Speck WT. Phototherapy for neonatal jaundice: optimal wavelengths of light. *J Pediatr* 1983; 103: 295-9.

521 Lockwood DB, Wataha JC, Lewis JB *et al.* Blue light generates reactive oxygen species (ROS) differentially in tumor vs. normal epithelial cells. *Dent Mater* 2005; 21: 683-8.

522 Ohara M, Kawashima Y, Watanabe H *et al.* Effects of blue-light-exposure on growth of extracorporeally circulated leukemic cells in rats with leukemia induced by 1-ethyl-1-nitrosourea. *Int J Mol Med* 2002; 10: 407-11.

523 Ohara M, Kawashima Y, Kitajima S *et al.* Blue light inhibits the growth of skin tumors in the v-Ha-ras transgenic mouse. *Cancer Sci* 2003; 94: 205-9.

524 Vreman HJ, Wong RJ, Stevenson DK *et al.* Light-emitting diodes: a novel light source for phototherapy. *Pediatr Res* 1998; 44: 804-9.

525 Porebska-Budny M, Sakina NL, Stepien KB *et al.* Antioxidative activity of synthetic melanins. Cardiolipin liposome model. *Biochim Biophys Acta* 1992; 1116: 11-6.

526 Bourre L, Thibaut S, Briffaud A *et al.* Indirect detection of photosensitizer ex vivo. *J Photochem Photobiol B* 2002; 67: 23-31.

527 Bourre L, Rousset N, Thibaut S *et al.* PDT effects of m-THPC and ALA, phototoxicity and apoptosis. *Apoptosis* 2002; 7: 221-30.

528 Reiners JJ, Jr., Caruso JA, Mathieu P *et al.* Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ* 2002; 9: 934-44.

529 Chiu SM, Xue LY, Azizuddin K *et al.* Photodynamic therapy-induced death of HCT 116 cells: Apoptosis with or without Bax expression. *Apoptosis* 2005; 10: 1357-68.

530 Komoriya A, Packard BZ, Brown MJ *et al.* Assessment of caspase activities in intact apoptotic thymocytes using cell-permeable fluorogenic caspase substrates. *J Exp Med* 2000; 191: 1819-28.

531 Klionsky DJ. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 931-7.

532 Mizushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 2007; 21: 2861-73.

533 Cuervo AM. Autophagy: many paths to the same end. *Mol Cell Biochem* 2004; 263: 55-72.

534 Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J *et al.* DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 2006; 126: 121-34.

535 Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A *et al.* Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 741-52.

536 Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol* 2007; 78: 217-45.

537 Deretic V. Autophagy as an immune defense mechanism. *Curr Opin Immunol* 2006; 18: 375-82.

538 Lenardo MJ, McPhee CK, Yu L. Autophagic cell death. *Methods Enzymol* 2009; 453: 17-31.

539 Lorin S, Codogno P, Djavaheri-Mergny M. L'autophagie: un nouveau concept en cancérologie. *Bull Cancer* 2008; 95: 43-50.

540 Levine B. Autophagy and Cancer. *Nature* 2007; 446: 745-7.

541 Ogier-Denis E, Codogno P. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1603: 113-28.

542 Mathew R, Kongara S, Beaudoin B *et al.* Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 2007; 21: 1367-81.

543 Levine B, Klionsky DJ. Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; 6: 463-77.

544 Jin S, White E. Role of autophagy in cancer: management of metabolic stress. *Autophagy* 2007; 3: 28-31.

545 Codogno P, Meijer AJ. Autophagy and signaling: their role in cell survival and cell death. *Cell Death Differ* 2005; 12 1509-18.

546 Pattingre S, Tassa A, Qu X *et al.* Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005; 122: 927-39.

547 Pattingre S, Levine B. Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res* 2006; 66: 2885-8.

548 Sinha S, Levine B. The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein. *Oncogene* 2008; 27 S137-48.

549 Tawbi HA, Kirkwood JM. Management of metastatic melanoma. *Semin Oncol* 2007; 34: 532-45.

550 Fecher LA, Amaravadi RK, Flaherty KT. The MAPK pathway in melanoma. *Curr Opin Oncol* 2008; 20: 183-9.

551 Hersey P, Zhuang L, Zhang XD. Current strategies in overcoming resistance of cancer cells to apoptosis melanoma as a model. *Int Rev Cytol* 2006; 251: 131-58.

552 Ivanov VN, Bhoumik A, Ronai Z. Death receptors and melanoma resistance to apoptosis. *Oncogene* 2003; 22: 3152-61.

553 Gray-Schopfer V, Wellbrock C, Marais R. Melanoma biology and new targeted therapy. *Nature* 2007; 445: 851-7.

554 Del Bello B, Moretti D, Gamberucci A *et al.* Cross-talk between calpain and caspase-3/-7 in cisplatin-induced apoptosis of melanoma cells: a major role of calpain inhibition in cell death protection and p53 status. *Oncogene* 2007; 26: 2717-26.

555 Kanzawa T, Germano IM, Komata T *et al.* Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ* 2004; 11: 448-57.

556 Mathieu V, Le Mercier M, De Neve N *et al.* Galectin-1 knockdown increases sensitivity to temozolomide in a B16F10 mouse metastatic melanoma model. *J Invest Dermatol* 2007; 127: 2399-410.

557 Lazova R, Klump V, Pawelek J. Autophagy in cutaneous malignant melanoma. *J Cutan Pathol* 2010; 37: 256-68.

558 Maddodi N, Huang W, Havighurst T *et al.* Induction of Autophagy and Inhibition of Melanoma Growth In Vitro and In Vivo by Hyperactivation of Oncogenic BRAF. *J Invest Dermatol* 2010.

559 Tormo D, Checinska A, Alonso-Curbelo D *et al.* Targeted activation of innate immunity for therapeutic induction of autophagy and apoptosis in melanoma cells. *Cancer Cell* 2009; 16: 103-14.

560 Kato H, Takeuchi O, Sato S *et al.* Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature* 2006; 441: 101-5.

561 Li B, Lei Z, Lichty BD *et al.* Autophagy facilitates major histocompatibility complex class I expression induced by IFN-gamma in B16 melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 2009.

562 Yorimitsu T, Klionsky DJ. Endoplasmic reticulum stress: a new pathway to induce autophagy. *Autophagy* 2007; 3: 160-2.

563 Hersey P, Zhang XD. Adaptation to ER stress as a driver of malignancy and resistance to therapy in human melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res* 2008; 21: 358-67.

564 Kim H, Ronai Z. Tricking melanoma to self-digest: a deal of a meal! *Cancer Cell* 2009; 16: 83-4.

565 Handerson T, Pawelek JM. Beta1,6-branched oligosaccharides and coarse vesicles: a common, pervasive phenotype in melanoma and other human cancers. *Cancer Res* 2003; 63: 5363-9.

566 Buytaert E, Callewaert G, Hendrickx N *et al.* Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB J* 2006; 20: 756-8.

567 Buytaert E, Dewaele M, Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1776: 86-107.

568 Kim HR, Luo Y, Li G *et al.* Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after bcl-2 transfection. *Cancer Res* 1999; 59: 3429-32.

569 Kessel D, Oleinick NL. Initiation of autophagy by photodynamic therapy. *Methods Enzymol* 2009; 453: 1-16.

570 Buytaert E, Callewaert G, Vandenheede JR *et al.* Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum. *Autophagy* 2006; 2: 238-40.

571 Sasnauskiene A, Kadziauskas J, Vezelyte N *et al.* Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior. *Apoptosis* 2009; 14: 276-86.

572 Robinson SJ, Healy E. Human melanocortin 1 receptor (MC1R) gene variants alter melanoma cell growth and adhesion to extracellular matrix. *Oncogene* 2002; 21: 8037-46.

573 Zuliani T, Duval R, Jayat C *et al.* Sensitive and reliable JC-1 and TOTO-3 double staining to assess mitochondrial transmembrane potential and plasma membrane integrity: interest for cell death investigations. *Cytometry A* 2003; 54: 100-8.

574 Kuma A, Hatano M, Matsui M *et al.* The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004; 432: 1032-6.

575 Davids LM, Kleemann B, Cooper S *et al.* Melanomas display increased cytoprotection to hypericin-mediated cytotoxicity through the induction of autophagy. *Cell Biol Int* 2009; 33: 1065-72.

576 Hearing VJ. Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *J Dermatol Sci* 2005; 37: 3-14.