



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

Par Marlène PERNOT

**Amélioration de l'efficacité en thérapie photodynamique par
couplage d'un photosensibilisateur à des molécules actives**

12 novembre 2012

Membres du jury :

Rapporteurs : Gilles LEMERCIER	PU, ICMR, Université de Reims
Vincent SOL	PU, LCSN, Université de Limoges
Examineurs : Michel LINDER	PU, LIBIO, Université de Lorraine
François LUX	MCF, LPCML, Université Lyon 1
Muriel BARBERI-HEYOB	CR CAV (HdR), CRAN, Université de Lorraine Directrice de thèse
Céline FROCHOT	DR2 CNRS, LRGP, Université de Lorraine Co-directrice de thèse
Membres invités : Thierry BASTOGNE	MCU, CRAN, INRIA, Université de Lorraine
Bruno THERRIEN	DR, Institut de Chimie, Université de Neuchâtel

Remerciements

Je remercie le **Centre de Recherche en Automatisme de Nancy** pour leur accueil au sein de leur unité de recherche, et le **Centre Alexis Vautrin** pour leur accueil dans leur établissement.

Je tiens à remercier **Muriel Barberi-Heyob** qui m'a donnée l'opportunité de réaliser ma thèse sur un sujet intéressant et dans de bonnes conditions. Vous m'avez offert tous les moyens nécessaires pour accomplir mon doctorat et vous m'avez guidée tout au long de mes recherches. Je vous remercie également pour la confiance et l'autonomie que vous m'avez accordées dans mon travail de recherche et lors des nombreux congrès nationaux et internationaux auxquels vous m'avez fait participer.

Je remercie sincèrement **Céline Frochot** pour sa présence, son aide précieuse et son enthousiasme, mais également pour son soutien important lors de ma soutenance de thèse.

Je remercie le Docteur **Bruno Therrien** pour notre collaboration, essentielle à la réalisation de ma thèse. Vous m'avez fait confiance tout au long de ce travail et vous m'avez fait l'honneur de juger mon doctorat.

Je remercie également les Professeurs **Gilles Lemerrier**, **Vincent Sol** et **Michel Linder** et le Docteur **François Lux** pour m'avoir fait l'honneur de juger mon travail de thèse. J'ai beaucoup apprécié vos remarques et vos interrogations très intéressantes.

Je remercie **Thierry Bastogne** pour m'avoir fait découvrir les plans d'expériences et pour notre collaboration de 3 ans. J'ai beaucoup apprécié ta bonne humeur et ton enthousiasme.

Je tiens également à remercier toutes les personnes qui m'ont données de leur temps pour m'aider dans mon travail : **Régis Vanderesse** et **Mathilde Achard**, pour la synthèse peptidique, **Philippe Arnoux**, pour la caractérisation photophysique de mes molécules et pour ton intérêt et ton aide concernant les complexes de ruthénium, **Philippe Becuwe** et **Marie Ennen**, pour les transfections cellulaires et les RT-PCR et **Dominique Dumas**, pour les images de microscopie confocale.

Je remercie également **Sophie Pinel** et **Sabine Mouton** pour l'hébergement et les soins apportés à mes souris.

Je remercie tous **mes collègues** pour leur bonne humeur, leur soutien et simplement leur présence. J'ai beaucoup apprécié ces 3 années passées ensemble, nos week end dans les Vosges, nos repas de Noël, nos sorties canoë... Je tiens à remercier particulièrement **Aurélien François** qui m'a aidée et guidée dans mes travaux. Tu m'as initiée à de nombreuses techniques.

Dans le cadre de mon monitorat, je remercie chaleureusement **Catherine Caillez-Grimal** et **Loreto Tonti** pour leur accueil et leur aide très précieuse dans ce travail d'enseignement. J'ai beaucoup apprécié ce travail et notre collaboration.

Je remercie **Albert** et **Gaëlle**, mes collègues devenus amis, avec qui j'ai partagé de très bons moments, et notamment en congrès...

Je remercie très fortement mes parents, **Brigitte** et **Serge**, mon frère, **Mathieu**, et **Nicolas** pour leur soutien moral durant ces 3 années. Le doctorat est une grande expérience, enrichissante, mais également difficile. Cette expérience n'aurait pu se faire sans vous et votre présence. Merci pour tout.

Je tiens également à rendre hommage aux animaux sacrifiés pour la réalisation de ce travail de recherche. J'ai toujours mené mes expériences dans le plus grand respect de l'animal et des règles d'éthique et j'ai toujours cherché à limiter leur souffrance. L'expérimentation animale est encore nécessaire pour la recherche mais j'espère sincèrement que l'Homme parviendra rapidement à remplacer ces expériences par des outils *in vitro*.

Je dédie ma thèse à mes parents

SOMMAIRE

Productions scientifiques.....	1
Liste des figures.....	3
Liste des tableaux.....	5
Liste des abréviations.....	7
INTRODUCTION GENERALE.....	11

PARTIE I : Introduction bibliographique

I. <u>Thérapie Photodynamique</u>.....	13
1. Principe.....	13
2. Photosensibilisateurs.....	16
3. Affinité des photosensibilisateurs pour les tissus tumoraux.....	19
4. Système réticulo-endothélial.....	21
5. Mécanismes de l'éradication tumorale post-PDT.....	22
a. Effets directs de la PDT.....	24
b. Effets vasculaires induits par PDT.....	26
c. Effets inflammatoires et immunitaires en PDT.....	27
6. Applications cliniques en PDT.....	23
II. <u>Stratégies de ciblage en PDT</u>.....	33
1. Ciblage passif.....	33
a. Liposomes.....	33
b. Nanoparticules.....	36
c. Micelles.....	39
d. Dendrimères.....	40
2. Ciblage actif.....	41

Partie II : Ciblage de la vascularisation tumorale en PDT

<u>I. Vascularisation tumorale.....</u>	71
1. Morphologie et angiogenèse de la vascularisation tumorale.....	71
2. Angiogenèse tumorale.....	72
a. Initiation de l'angiogenèse : le <i>switch</i> angiogénique.....	74
b. Bourgeonnement.....	75
c. Migration.....	75
d. Remodelage vasculaire.....	76
<u>II. Facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF).....</u>	77
1. VEGF-A.....	77
2. Autres membres de la famille du VEGF.....	78
3. Récepteurs au VEGF.....	79
a. Récepteurs à activité tyrosine kinase.....	79
b. Neuropilines.....	81
<u>III. Ciblage vasculaire en PDT.....</u>	85
1. Ciblage vasculaire passif.....	85
2. Ciblage vasculaire actif.....	86
3. Ligands peptidiques en VTP.....	86
<u>IV. Intérêt des peptides biologiquement plus stables.....</u>	91
<u>V. Validation de l'intérêt des pseudopeptides.....</u>	103
<u>VI. Synthèse générale et perspectives.....</u>	115

Partie III : Couplage de la cytotoxicité du ruthénium avec la phototoxicité de la PDT

<u>I. Agents alkylants à base de métal.....</u>	119
1. Les complexes ruthénium-polypyridyl.....	122
2. Intérêt des complexes à base de ruthénium pour potentialiser l'efficacité en PDT.....	125
<u>II. Couplage de la porphyrine au ruthénium.....</u>	149
1. Sélection du conjugué le plus efficace.....	151
2. Détermination des conditions optimales de traitement pour Rut4.....	185
a. Matériel et méthodes.....	185
b. Résultats et discussion.....	186
3. Efficacité anti-tumorale du composé Rut4 avec les conditions optimales de traitement.....	190
a. Matériel et méthodes.....	190
b. Résultats et discussion.....	190
<u>III. Couplage de la chlorine au ruthénium.....</u>	193
1. Détermination des conditions optimales de traitement pour ChloRut.....	193
a. Matériel et méthodes.....	193
b. Résultats et discussion.....	194
2. Efficacité anti-tumorale du composé ChloRut avec les conditions optimales de traitement.....	199
a. Matériel et méthodes.....	199
b. Résultats et discussion.....	201
<u>IV. Synthèse générale et perspectives.....</u>	205
Références bibliographiques.....	209

Productions scientifiques

Publications :

- Thomas N, Pernot M, Vanderesse R, Becuwe P, Kamarulzaman E, Da Silva D, François A, Frochot C, Guillemin F, Barberi-Heyob M.
Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides with improved stability properties, **Biochem. Pharmacol.** (2010) 80, 226-35.
- Pernot M, Vanderesse R, Frochot C, Guillemin F, Barberi-Heyob M.
Stability of peptides and therapeutic success in cancer, **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.** (2011) 7, 793-802.
- Pernot M, Bastogne T, Barry N, Therrien B, Koellensperger G, Hann S, Reshetov V, Barberi-Heyob M.
System Biology Approach for in vivo Photodynamic Therapy Optimization of Ruthenium-Porphyrin Compounds, **J. Photochem. Photobiol. B** (2012), sous press.
- Pernot M, Therrien B, Frochot C, Barberi-Heyob M.
Ruthenium: potential interest in targeting strategies for photodynamic therapy, soumis à **Current Medicinal Chemistry** (2012).
- Pernot M, Frochot C, Vanderesse R, Barberi-Heyob M.
Book chapter "Targeting strategies in photodynamic therapy for cancer treatment", in Hamblin M and Mroz P (eds), *Advances in photodynamic therapy II*, **Artech House**, (2012), sous press.

Communications orales et par affiche :

- Pernot M, Thomas N, Vanderesse R, Frochot C, Guillemin F, Barberi-Heyob M.
Thérapie photodynamique ciblant neuropiline-1 : intérêt des pseudopeptides biologiquement plus stables, **GDR Photomed** Paris 2010, communication orale.
- Pernot M, Thomas N, Vanderesse R, Becuwe P, Kamarulzaman E, Da Silva D, François A, Frochot C, Guillemin F, Barberi-Heyob M.
Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides with improved stability properties, **The 8th International Symposium of "Photodynamic Therapeutic and Photodiagnosis in Clinical Practice"**, Brixen 2010, communication par affiche

- Pernot M, Thomas N, Vanderesse R, Becuwe P, Kamarulzaman E, Da Silva D, François A, Frochot C, Guillemin F, Barberi-Heyob M.
Thérapie photodynamique anti-vasculaire ciblant Neuropiline-1 : utilisation de pseudopeptides biologiquement plus stables, **6^{ème} Journée Claude Huriet**, Nancy 2010 et **17^{ème} congrès du Groupe Français des Peptides et des Protéines GFPP**, Aussois 2011, communication par affiche.
- Pernot M, Bastogne T, Reshetov V, Hann S, Therrien B, Barberi-Heyob M.
In vivo optimization by a system biology approach of photodynamic therapy modalities for ruthenium-porphyrin compounds, **The 7th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines ICPP-7**, Jeju (Corée du Sud) 2012, communication par affiche.

Liste des figures

Figure 1 : Principe général de la thérapie photodynamique.....	5
Figure 2 : Diagramme simplifié schématique de Perrin-Jablonski et les types de réactions photochimiques engendrées.....	7
Figure 3 : Structure chimique du noyau de base porphyrinique.....	8
Figure 4 : Classification des photosensibilisateurs.....	9
Figure 5 : Illustration de l'absorption et de la pénétration de la lumière dans les tissus en fonction de sa longueur d'onde.....	10
Figure 6 : Schéma des différences structurales entre le tissu sain et le tissu tumoral, pouvant illustrer le ciblage passif des tumeurs par les photosensibilisateurs.....	13
Figure 7 : Mécanismes de destruction tumorale associée à la PDT.....	16
Figure 8 : Schéma non exhaustif des différentes voies de signalisation intracellulaire conduisant à l'apoptose après PDT, dépendamment de la localisation cellulaire des photosensibilisateurs.....	19
Figure 9 : Illustration schématique de nanostructures liposomales.....	29
Figure 10 : Exemple de nanoplateforme multifonctionnelle pour la PDT, suggérée par notre équipe.....	34
Figure 11 : Comparaison de la morphologie entre les vaisseaux sanguins normaux et tumoraux par microscopie électronique à balayage.....	65
Figure 12 : L'angiogenèse tumorale.....	66
Figure 13 : Activation de l'expression de VEGF-A par l'état hypoxique de la cellule.....	67
Figure 14 : Gène du VEGF-A et son épissage alternatif.....	71
Figure 15 : Structure des neuropilines et leurs ligands.....	75
Figure 16 : Modélisation du complexe formé entre NRP-1, VEGF-A ₁₆₅ et VEGFR-2.....	77
Figure 17 : Mécanisme de complexation entre la plexine, NRP-1 et SEMA-3.....	78
Figure 18 : TPC [5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylchlorine] couplée au peptide ATWLPPR par l'intermédiaire d'un bras espaceur (acide hexanoïque), conjugué noté TPC-Ahx-ATWLPPR.....	83
Figure 19 : Structure chimique des complexes de Pt(II) cisplatine, carboplatine, oxaliplatine.	111
Figure 20 : Principaux mécanismes d'action des complexes métalliques anti-tumoraux et leurs interactions avec les voies du stress oxydatif et de la balance redox intracellulaire.....	112

Figure 21 : Transitions électroniques au sein d'un complexe ruthénium-polypyridyl après excitation photonique.....	114
Figure 22 : Diagramme de Jablonski des complexes ruthénium-polypyridyl.....	115
Figure 23 : Formation d' ¹ O ₂ après excitation photonique de complexes ruthénium-polypyridyl.....	116
Figure 24 : Complexes porphyrine-Ru mono- ou tétranucléaires couplés à la 4-pyridylporphyrine (4-pp) ou à la 3-pyridylporphyrine (3-pp).....	141
Figure 25 : Représentations graphiques de suivi de croissance tumorale.....	145
Figure 26 : Représentation graphique de la synergie entre concentration en Rut4 et fluence..	181
Figure 27 : Représentation de Kaplan-Meyer de la croissance tumorale des tumeurs KB après PDT avec Rut4 comparé au groupe témoin.....	183
Figure 28 : Structure moléculaire de ChloRut, Ru ₄ (η ⁶ -p-Pr ⁱ C ₆ H ₄ Me) ₄ (tetra-3-pyridylchlorine)Cl ₈ , spectres d'absorption de ChloRut et Chlo et spectres d'absorption et de fluorescence (λ _{max} présentées) ont été mesurés dans l'éthanol.....	188
Figure 29 : Suivi post-PDT de la croissance tumorale pour chaque condition d'irradiation avec ChloRut.....	192
Figure 30 : Cinétique de l'intensité de fluorescence centrée réduite des composés Chlo et ChloRut injectés chez la souris <i>nude</i> par voie i.v. à la dose de 1,75 μmol/kg.....	195
Figure 31 : Etude comparative de la localisation intracellulaire des composés Chlo et ChloRut au niveau des lysosomes, des mitochondries et du réticulum endoplasmique.....	196
Figure 32 : Image de microscopie confocale évaluant la colocalisation cellulaire des composés Chlo et ChloRut au niveau du réticulum-endoplasmique en utilisant un marqueur d'organites.....	197
Figure 33 : Représentation de Kaplan-Meyer évaluant l'efficacité anti-tumorale du composé ChloRut dans les conditions de traitement retenues du plan d'expérience et des approches expérimentales exploratoires précédentes (IDL 72h, fluence de 100 J/cm ² , irradiance de 80 mW/cm ² , concentration en ChloRut de 4 μmol/kg).....	198

Liste des tableaux

Tableau I : Les photosensibilisateurs ayant une AMM ou l'agrément de la FDA.....	24
Tableau II : Affinité des membres de la famille du VEGF pour leurs récepteurs (valeur des constantes de dissociation K_d en mol.L^{-1}).....	73
Tableau III : Avantages et inconvénients des peptides pour l'adressage d'agents thérapeutiques.....	81
Tableau IV : Efficacité photodynamique des différents complexes porphyrine-Ru étudiés par Schmitt F et <i>al.</i>	142
Tableau V : Domaine expérimental pour l'optimisation de Rut4.....	179
Tableau VI : Plan d'expérience et modalités de traitement pour l'optimisation de Rut4.....	179
Tableau VII : Résultats de l'étude statistique du plan d'expérience pour l'optimisation de Rut4.....	180
Tableau VIII : Domaine expérimental pour l'optimisation de ChloRut.....	189
Tableau IX : Plan d'expérience et modalités de traitement pour l'optimisation de ChloRut...	190
Tableau X : Valeurs des différents paramètres de traitement avec ChloRut et la valeur moyenne de leur IDGR.....	191
Tableau XI : Significativité des coefficients des différents facteurs d'optimisation de ChloRut et leurs interactions.....	191

Liste des abréviations

Ac	Anticorps	EGF	Epidermal growth factor
ADN	Acide désoxyribonucléique	ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
Ag	Antigène		
Ahx	Acide hexanoïque	EPR	Enhanced permeability and retention
ALA	Acide 5-aminolévulinique		
AMM	Autorisation de mise sur le marché	ERO	Espèce réactive de l'oxygène
Ang	Angiopoïétine	EtOH	Ethanol
ANOVA	Analyse de la variance	FDA	Food and drug administration
ARN	Acide ribonucléique		
ATP	Adénosine triphosphate	FGF	Foetal growth factor
BDP-MA	Dérivé de benzoporphyrine monoacide	GM ₁	Monosialoganglioside
		GSH	Glutathion
BHE	Barrière hémato-encéphalique	GR	Glutathion réductase
		HDL	High density lipoprotein
Ca ²⁺	Calcium	HIF	Hypoxia inductible factor
Chlo	Tetra-3-pyridylchlorine	HpD	Hematoporphyrin Derivatives
ChloRut	Ru ₄ (η ⁶ -p-Pr ⁱ C ₆ H ₄ Me) ₄ (tetra-3-pyridylchlorine)Cl ₈	HPLC	High performance liquid chromatography
CPA	Cellules présentatrices d'antigène	HUVEC	Human umbilical vein endothelial cell
Cyt c	Cytochrome c	IC ₅₀	Inhibitory Concentration 50
DiOC ₆	3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide	ICAM	Intercellular adhesion molecule
		IDGR	Intrinsic diameter growth rate
DL ₅₀	Dose létale 50		
DMLA	Dégénérescence maculaire liée à l'âge	IDL	Intervalle drogue-lumière
		IR	Infra-rouge
DO	Densité optique		

IRM	Imagerie par résonance magnétique	PVP	Polyvinylpyrrolidone
i.v.	Intra-veineuse	RE	Réticulum endoplasmique
LDL	Low density lipoprotein	RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
L-L	Ligand-ligand transition	Ru	Ruthénium
LMCT	Ligand-to-metal charge transfer	Rut	$Ru(\eta^6-p-Pr^iC_6H_4Me)Cl_2(pyridine)$
MC	Metal centered	Rut1	$Ru(\eta^6-p-Pr^iC_6H_4Me)(5-(3-pyridyl)-10,15,20-triphenylporphyrin)Cl_2$
MEC	Matrice extracellulaire	Rut4	$Ru_4(\eta^6-p-Pr^iC_6H_4Me)_4(5,10,15,20-tetra(3-pyridyl)porphyrin)Cl_8$
MLCT	Metal-to-ligand charge transfer	S.E.	Erreur standard
MMP	Métalloprotéinase matricielle	SEMA	Sémaphorine
mTc	Technétium métastable	SOD	Superoxyde dismutase
m-THPC	<i>méso</i> -(tétrahydroxyphényl)chlorine	SPC	Soybean phosphatidylcholine
NK	Natural killer	SRE	Système réticulo-endothélial
NO	Oxyde nitrique	TEG	Triéthylène glycol
NP	Nanoparticule	TGF	Transforming growth factor
NRP-1	Neuropiline-1	Tie2/Tek	Tunica internal endothelial cell kinase
1O_2	Oxygène singulet	tPA	Activateur de plasminogène de type tissulaire
O ₂	Oxygène moléculaire	TPC	Tétraphénylchlorine
PC	Proprotein convertases	TPP	Tetraphenylporphyrine
Pc4	Phtalocyanine 4	TPx	Thioredoxine peroxydase
PEG	Polyéthylène glycol	Trx	Thioredoxine
PDT	Thérapie Photodynamique	uPA	Activateur du plasminogène de type urokinase
PLA	Poly(D, L lactic acid)	UV	Ultra-violet
PLGA	Poly(lactic-co-glycolic acid)		
PIGF	Placenta growth factor		
Pp	Pyridylporphyrine		
PpIX	Protoporphyrine IX		
PS	Photosensibilisateur		
P _{sortie fibre}	Puissance en sortie de fibre		
Pt	Platine		

VCAM	Vascular cell adhesion molecule	VRF	VEGF-related factor
VEGF	Vascular endothelial growth factor	VTP	Vascular Targeted Photodynamic therapy
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor		

Introduction générale

La thérapie photodynamique (PDT) est un traitement loco-régional pour des applications en dermatologie, ophtalmologie et en cancérologie. Son principe est basé sur l'association de l'oxygène, de la lumière et d'un photosensibilisateur (molécule photo-activable) non toxique à l'obscurité. Après son activation par la lumière, le photosensibilisateur transfère son énergie à l'oxygène moléculaire présent dans les tissus pour former des espèces réactives de l'oxygène (*e.g.* l'oxygène singulet). En oncologie, la PDT conduit à la destruction directe des cellules tumorales, à l'altération de la vascularisation associée à la lésion traitée et à une réponse immunitaire. Malgré l'efficacité de traitement prouvée de la PDT en cancérologie, cette stratégie thérapeutique présente toutefois des limites. Le manque de sélectivité cellulaire des photosensibilisateurs peut engendrer une photosensibilisation cutanée et oculaire. De plus, la PDT s'affiche comme une modalité de traitement des petites tumeurs localisées : la faible pénétration tissulaire de la lumière ne permet pas l'irradiation en surface des grosses tumeurs. La première partie de ce manuscrit de thèse traite des généralités de la PDT et introduit la notion de ciblage en PDT. Nous avons d'ailleurs dédié un chapitre de livre au ciblage actif en PDT, publié dans *Advances in photodynamic therapy II* de Hamblin et Mroz [1].

Le premier objectif de ce travail de thèse a été d'améliorer la sélectivité vasculaire en PDT par ciblage actif de la vascularisation tumorale. Ce travail est présenté dans la deuxième partie de ce manuscrit. En favorisant l'effet vasculaire en PDT, les tumeurs sont asphyxiées et leur croissance tumorale est ralentie voire inhibée. Cette stratégie a été mise en place par le couplage d'une molécule d'adressage à un photosensibilisateur. L'approche précédemment étudiée au laboratoire avait consisté à coupler un photosensibilisateur, la tétraphénylchlorine (TPC), *via* un bras espaceur, à un heptapeptide (ATWLPPR) spécifique d'un récepteur au VEGF, neuropiline-1 (NRP-1), surexprimé par les cellules endothéliales de phénotype angiogénique. La tumeur en hypoxie promeut l'angiogénèse ; NRP-1 est alors surexprimé au niveau des néo-vaisseaux tumoraux. Le conjugué ainsi synthétisé avait démontré son efficacité *in vitro* et *in vivo* pour le ciblage vasculaire et l'éradication tumorale en PDT. Cependant, la partie peptidique du conjugué s'était révélée instable *in vivo* à l'attaque enzymatique des peptidases. En effet, les peptides revêtent un intérêt dans diverses thérapies mais leur utilisation présente des limites du fait de leur dégradation dans l'organisme. Nous avons écrit une revue, publiée dans *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, décrivant ce phénomène et les différentes stratégies employées par les chimistes pour stabiliser les peptides *in vivo* [2]. Nous avons donc modifié le peptide ATWLPPR au niveau

du site de clivage par les peptidases et nous avons synthétisé deux pseudopeptides (aTWLPPR et Aψ[CH₂NH]TWLPPR) dont les études *in vitro* et de stabilité *in vivo* sont présentées dans ce manuscrit et ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Biochemical Pharmacology* [3].

Dans la 3^{ème} partie de ce manuscrit, nous avons donc appréhendé l'intérêt de coupler le ruthénium à des photosensibilisateurs de type porphyrine et chlorine. Dans notre revue, soumise au journal *Current Medicinal Chemistry*, nous rappelons l'utilisation du ruthénium comme molécule thérapeutique en oncologie et nous développons l'intérêt de son couplage à un photosensibilisateur. Les cellules tumorales en prolifération accrue surexpriment le récepteur à la transferrine pour augmenter leur apport en fer. Or, après son injection par voie intra-veineuse, le ruthénium a la capacité de se lier à la transferrine au niveau du site de fixation du fer. Deux conjugués porphyrine-ruthénium [Ru(η⁶-*p*-PrⁱC₆H₄Me)(5-(3-pyridyl)-10,15,20-triphenylporphyrin)Cl₂, ou Rut1, et Ru₄(η⁶-*p*-PrⁱC₆H₄Me)₄(5,10,15,20-tetra(3-pyridyl)porphyrin)Cl₈, ou Rut4] ont été synthétisés, caractérisés et validés *in vitro* pour leur efficacité en PDT, par l'équipe du Docteur Bruno Therrien, à l'Université de Neuchâtel. Nous avons ensuite étudié *in vivo* les potentialités thérapeutiques en PDT de ces deux conjugués et un troisième, une chlorine conjuguée à quatre arènes de ruthénium [Ru₄(η⁶-*p*-PrⁱC₆H₄Me)₄(tetra-3-pyridylchlorine)Cl₈ ou ChloRut], par une méthodologie de plan d'expérience, sur un modèle de souris *nude* xénogreffées en ectopique avec des cellules de carcinome oral humain KB. Ces études sont également présentées dans ce manuscrit et ont fait l'objet d'une publication dans *Journal of Photochemistry and Photobiology B* [4].

Une synthèse générale et les perspectives de recherche sont développées à la fin de chacune des parties 2 et 3.

PARTIE I

Introduction bibliographique

I. Thérapie Photodynamique

1. Principe

La thérapie photodynamique ou PDT (PhotoDynamic Therapy) est un mode de traitement destiné à détruire des tissus par une réaction photochimique. De façon générale, la PDT utilise la combinaison d'une molécule photo-activable, le photosensibilisateur ou agent photosensibilisant, d'une source de lumière émettant dans le visible et d'oxygène moléculaire (O_2). Ainsi, le degré de vascularisation tumorale influence énormément l'efficacité de ce mode de traitement puisqu'elle apporte les photosensibilisateurs et l' O_2 nécessaires au processus photodynamique. En oncologie clinique, le photosensibilisateur, non toxique à l'obscurité, est administré par voie intraveineuse ou topique. Il est préférentiellement retenu par les tissus néoplasiques. Cette spécificité de fixation est liée en partie à l'histopathologie du tissu cancéreux, au phénotype tumoral et aux caractéristiques chimiques du photosensibilisateur [5] (**conf. PARTIE I, I. 3.**). La lésion néoplasique est ensuite irradiée à une longueur d'onde optimale pour l'activation du photosensibilisateur. Le délai entre l'administration du composé et l'irradiation du tissu cible est couramment dénommé « intervalle drogue-lumière » (IDL, drug-light interval) et correspond en général à la durée nécessaire pour un tropisme optimal du photosensibilisateur en faveur des tissus cibles par comparaison aux tissus sains [5] (**Figure 1**).

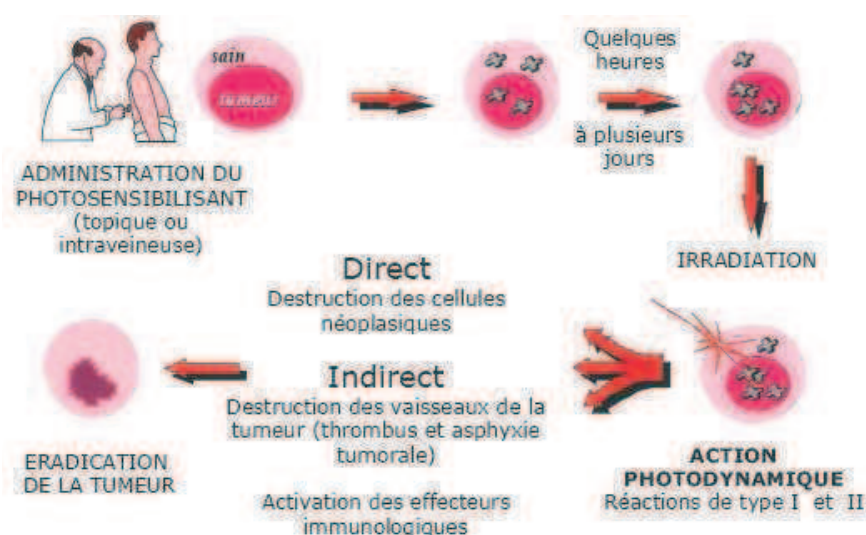


Figure 1 : Principe général de la thérapie photodynamique. Le photosensibilisateur est administré au patient par voie topique ou i.v. Après un intervalle de temps de quelques heures à plusieurs jours, le photosensibilisateur se localise préférentiellement au niveau du tissu tumoral. La tumeur est ensuite irradiée à la longueur d'onde optimale. La molécule photo-activable engendre alors des réactions de photo-oxydation qui vont conduire à la destruction des cellules tumorales et de ses vaisseaux sanguins et à l'activation d'une réponse immunitaire.

L'activité photodynamique du photosensibilisateur est basée sur des principes photophysiques induisant, dans un système biologique, des réactions de photo-oxydation de type I et II [5] (**Figure 2**). L'irradiation du photosensibilisateur induit une photo-activation de ce dernier, définie par son changement d'état. Par absorption de la lumière, le photosensibilisateur acquiert de l'énergie et passe d'un état de repos singulet S_0 à différents états singulets excités d'énergie supérieure S_1 et S_n . La molécule excitée possède un excès d'énergie. Le photosensibilisateur excité va soit perdre rapidement cette énergie par fluorescence ou par désactivation non radiative, soit passer à un état triplet excité ($^3PS_1^*$), qui se désactivera par phosphorescence ou bien sera responsable des phénomènes de photosensibilisation (**Figure 2**). Le photosensibilisateur à l'état triplet excité génère des espèces photo-actives à partir de deux voies de photo-oxydation cytotoxiques :

- La réaction de type I. Elle implique le transfert d'un électron ou d'un atome d'hydrogène entre $^3PS_1^*$ et des substrats biologiques pour former des radicaux et des ions radicalaires conduisant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ERO).
- La réaction de type II. Elle implique un transfert d'énergie de $^3PS_1^*$ vers O_2 qui passe alors à un état singulet excité ($^1O_2^*$). Les réactions de type II sont prépondérantes lors du processus de PDT [5]. $^1O_2^*$ revient à son état fondamental par émission de luminescence (1270 nm). Il possède une durée de vie très courte (quelques μs dans l'eau) et est très réactif, susceptible de réagir avec des substrats cellulaires situés dans l'environnement proche. Un grand nombre de substrats cellulaires tels que les acides aminés (cystéine, histidine, tryptophane, tyrosine et méthionine), les nucléosides (principalement la guanine) et les lipides insaturés peuvent réagir avec $^1O_2^*$ [6, 7]. $^1O_2^*$ peut également réagir avec le photosensibilisateur à l'état fondamental pour former des produits d'oxydation, dits photo-produits (phénomène de photoblanchiment ou de photo-modification). Ce phénomène se caractérise par une extinction plus ou moins rapide de la fluorescence du photosensibilisateur en imagerie.

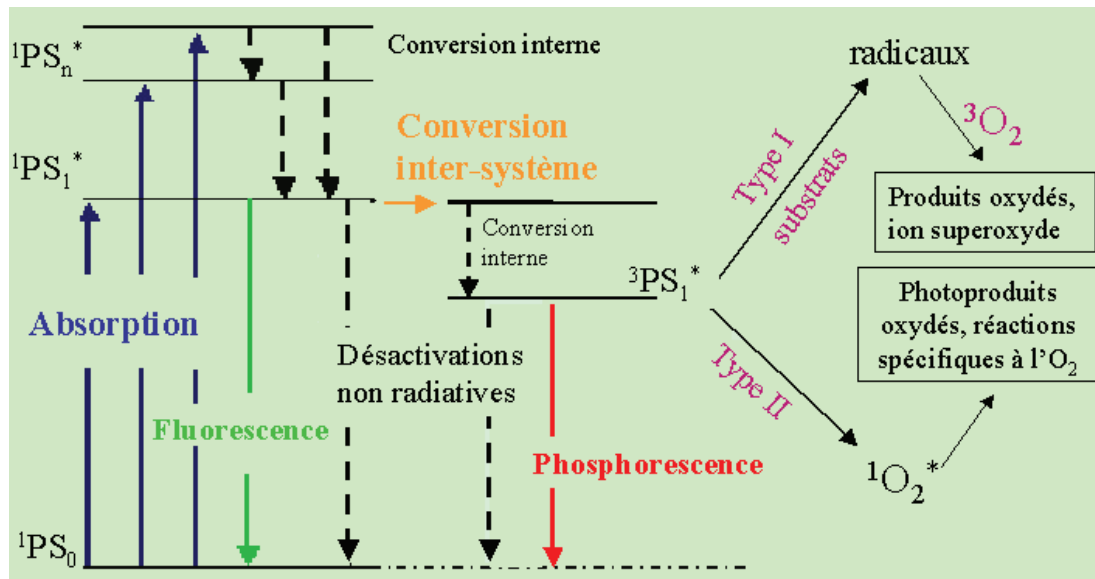


Figure 2 : Diagramme simplifié schématique de Perrin-Jablonski et les types de réactions photochimiques engendrées. Ce schéma représente les différents processus photophysiques intervenant après l'excitation d'une molécule photo-activable (PS). En absorbant une énergie lumineuse, le photosensibilisateur passe de son état singulet fondamental (1PS_0) à un état singulet excité ($^1PS_1^*$, $^1PS_n^*$...) correspondant à un état électronique d'énergie supérieure. Par succession de conversions internes, le photosensibilisateur revient à l'état excité de plus bas niveau d'énergie ($^1PS_1^*$). A ce stade deux processus entrent en compétition avec le passage à l'état triplet excité du photosensibilisateur ($^3PS_1^*$) : la désactivation non radiative (idéalement négligeable) et la fluorescence (utile pour la détection et l'imagerie des tumeurs). Sinon, la conversion inter-système mène à la formation de $^3PS_1^*$, de durée de vie plus longue (quelques μs) que l'état singulet (quelques ns), lui permettant de générer des espèces réactives de l'oxygène, dont l'oxygène singulet (type II), et d'interagir avec les substrats biologiques (type I).

Comparé à celui de la radiothérapie, le rayonnement non ionisant de la PDT est de moindre énergie et donc caractérisé comme non mutagène. De plus, la PDT présente une certaine sélectivité pour les tissus tumoraux, résultant de la localisation de l'irradiation lumineuse et du photosensibilisateur au niveau du tissu tumoral et de la faible durée de vie de 1O_2 . En revanche, certaines précautions doivent être prises lors d'une PDT afin de limiter les réactions de photosensibilisation : le malade doit éviter toute exposition au soleil ou aux lumières fortes pendant des périodes plus ou moins longues en fonction de la molécule photo-activable utilisée [8]. La PDT peut être également un traitement fortement algique [9].

2. Photosensibilisateurs

Les photosensibilisateurs utilisés en PDT sont des molécules photo-activables capables d'absorber l'énergie lumineuse afin de la transmettre au milieu extérieur local pour former des espèces réactives de l'oxygène. Ils sont capables de détruire les cellules environnantes *via* des mécanismes photochimiques décrits précédemment (**Conf. PARTIE I, I. 1.**). Il existe de nombreux photosensibilisateurs d'origine naturelle ou synthétique. Ceux utilisés en PDT sont facilement différenciables selon leur origine tétrapyrrolique ou non-tétrapyrrolique [10] (**Figure 3 et 4**) :

- les photosensibilisateurs non tétrapyrroliques (*e.g.* les psoralènes, le bleu de méthylène, l'hypéricine),
- les photosensibilisateurs tétrapyrroliques, dont la structure est basée sur celle de la porphyrine :
 - de 1^{ère} génération : les molécules d'origine naturelle,
 - de 2^{ème} génération : les molécules de synthèse,
 - de 3^{ème} génération : les molécules vectorisées.

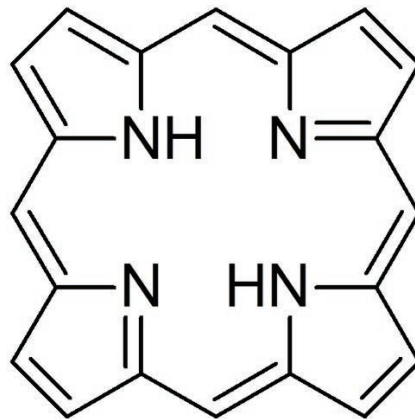


Figure 3 : Structure chimique du noyau de base porphyrinique.

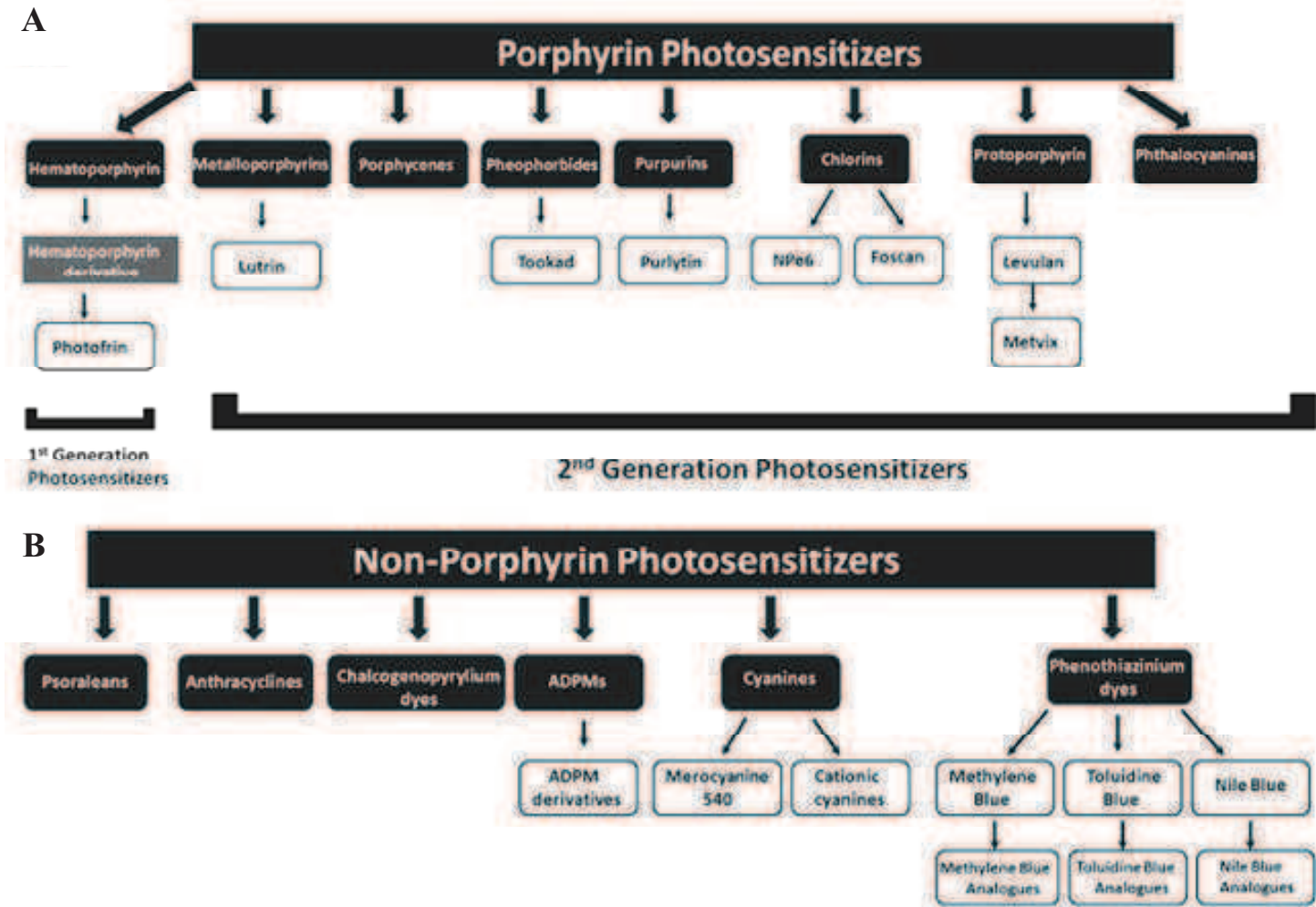


Figure 4 : Classification des photosensibilisateurs, d'après [10]. **A**, photosensibilisateurs tétrapyrroliques dont la structure est basée sur celle de la porphyrine. **B**, photosensibilisateurs non tétrapyrroliques

La 1^{ère} génération de photosensibilisateurs regroupe l'hématoporphyrine et ses dérivés (Hematoporphyrin Derivatives, HpD, commercialisés sous le nom de Photofrin[®]). L'HpD a été extraite en 1961 par Lipson à partir de l'hémoglobine du sang par un traitement avec un mélange d'acides sulfurique et acétique, suivi d'un traitement alcalin [11]. Il ne s'agit pas d'un composé pur mais d'un mélange de monomères et d'oligomères (polymères de porphyrine reliés par des ponts ester, éther et carbone) qui peuvent être partiellement séparés par HPLC (High Performance Liquid Chromatography). L'HpD présente une faible sélectivité pour les tissus cibles ainsi qu'une faible clairance [12] (**Conf. PARTIE I, I. 6.**). D'un point de vue photophysique, l'HpD absorbe les photons dans le bleu et le vert, longueurs d'onde qui pénètrent faiblement dans les tissus biologiques puisque absorbées principalement par la mélanine et l'hémoglobine (**Figure 5**).

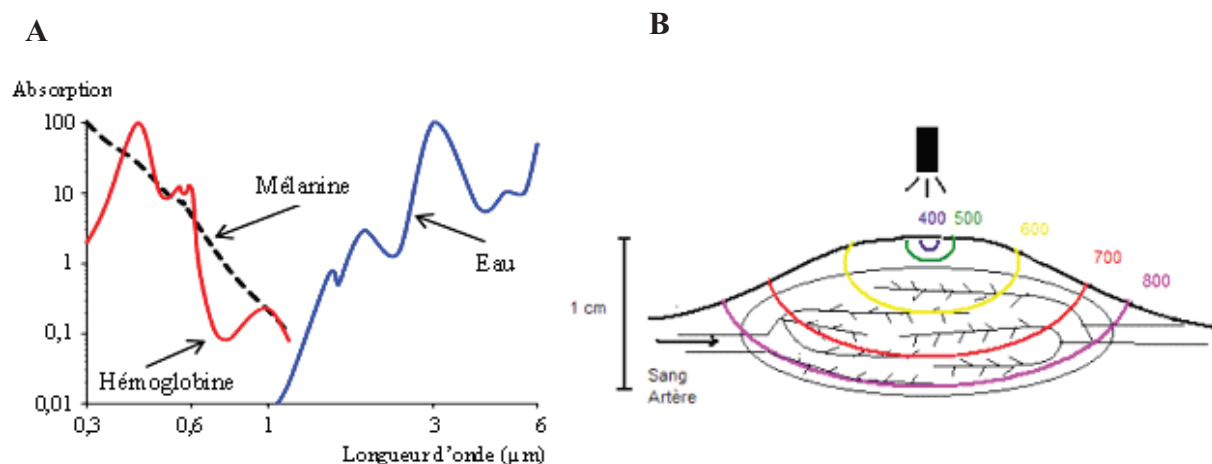


Figure 5 : Illustration de l'absorption et de la pénétration de la lumière dans les tissus en fonction de sa longueur d'onde. **A**, spectres d'absorption des principales molécules biologiques. **B**, profondeur de pénétration de la lumière dans un tissu en fonction de sa longueur d'onde (en nm).

L'utilisation de photosensibilisateurs de 1^{ère} génération présente donc des inconvénients qui ont conduit à la définition du photosensibilisateur idéal, devant posséder les caractéristiques chimiques, photophysiques et biologiques suivantes :

- pureté chimique, synthèse reproductible et facile ;
- faible toxicité à l'obscurité ;
- coefficient d'extinction molaire élevé à des longueurs d'onde situées dans la fenêtre thérapeutique, c'est à dire dans la région rouge du spectre de la lumière visible, voire dans le proche IR (600-850 nm) afin de permettre une pénétration tissulaire et une absorption de lumière par le photosensibilisateur optimale (**Figure 5**);

- bon rendement quantique de formation d'oxygène singulet. Pour cela, son rendement quantique en $^3\text{PS}_1^*$ doit être élevé, et la durée de vie de $^3\text{PS}_1^*$ et sa valeur énergétique doivent être suffisantes pour permettre le transfert d'énergie vers l' O_2 ;
- solubilité en milieu aqueux pour faciliter son administration systémique et éviter l'agrégation entre molécules de photosensibilisateurs qui inhibe leur fluorescence, l'accessibilité de l' O_2 et la production d' $^1\text{O}_2$ (phénomène de *quenching*) [13] ;
- clairance élevée pour limiter dans le temps la photosensibilité cutanée et ophtalmique de l'individu traité ;
- sélectivité élevée pour le tissu cible.

Afin de se rapprocher de ces caractéristiques « idéales », les photosensibilisateurs de 2^{ème} génération ont été développés. Ces photosensibilisateurs sont principalement des dérivés de chlorine, bactériochlorine ou phthalocyanine (**Figure 4**). Ce sont des composés purs avec notamment une bande d'absorption se situant entre 650 et 800 nm.

Les photosensibilisateurs de 3^{ème} génération sont des photosensibilisateurs de 2^{ème} génération modifiés de manière à cibler de façon passive (vectorisation) ou active (adressage) les tissus cibles (**Conf. PARTIE I, II**).

3. Affinité des photosensibilisateurs pour les tissus tumoraux

Plusieurs phénomènes caractérisent l'affinité ou le tropisme des photosensibilisateurs pour le tissu tumoral (**Figure 6**):

- Pour proliférer rapidement, les cellules tumorales exigent un apport important en cholestérol pour la biosynthèse membranaire et de ce fait, surexpriment le récepteur aux LDL (Low Density Lipoprotein) [14]. Les photosensibilisateurs hydrophobes se fixent aux LDL et peuvent être incorporés dans les cellules *via* des mécanismes d'endocytose LDL-récepteurs dépendants [15, 16]. En 2008, Kascakova *et al.* ont montré une corrélation entre le nombre de récepteurs aux LDL à la surface des cellules U87-MG et l'incorporation cellulaire d'hypéricine en présence de LDL [17]. D'autres études ont également démontré l'interaction de l'hypéricine et des LDL [16, 18].
- Les macrophages présents en grand nombre dans la zone tumorale phagocytent les photosensibilisateurs, les piégeant à proximité de la tumeur [19, 20].

- La vascularisation tumorale fenestrée (**conf. PARTIE II, I. 1.**) et le drainage lymphatique défectueux permettent une accumulation accrue des photosensibilisateurs dans le tissu tumoral et une clairance tumorale moindre [20].
- On observe une augmentation de la synthèse de collagène et de lipides qui lient respectivement les porphyrines et les photosensibilisateurs lipophiles [20].
- Les tumeurs présentent un pH extracellulaire plus acide que celui des tissus sains ($pH_{\text{tissu tumoral}}$ compris entre 6 et 7 *versus* $pH_{\text{tissu sain}} = 7,4$). Ce phénomène résulte principalement d'une glycolyse élevée. En condition hypoxique, la glycolyse favorise la synthèse de molécules de lactate, prises en charge par des transporteurs monocarboxylate qui déchargent alors un proton dans le microenvironnement tumoral [20]. Or, à pH acide, dépendamment de leur pKa, certains photosensibilisateurs sont non ionisés et présentent un caractère lipophile et, de ce fait, interagissent plus facilement avec les phospholipides membranaires des membranes cytoplasmiques [20, 21].

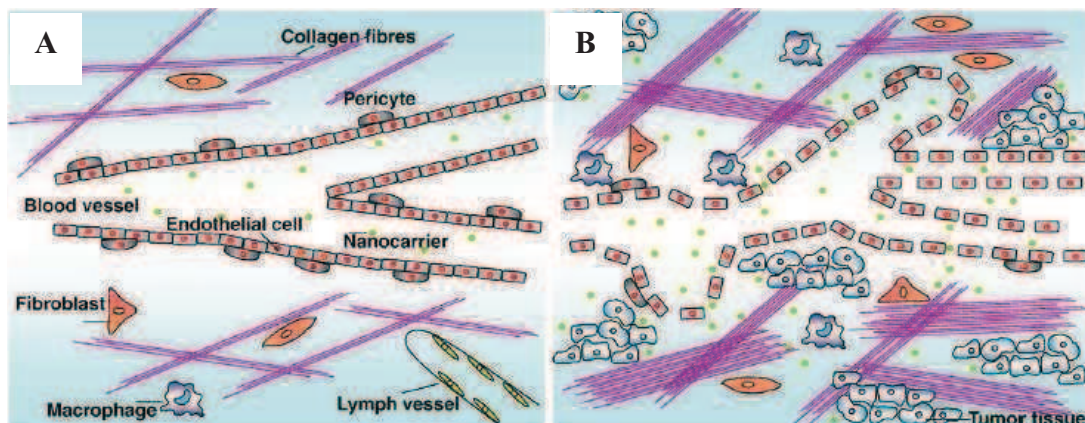


Figure 6 : Schéma des différences structurales entre le tissu sain et le tissu tumoral, pouvant illustrer le ciblage passif des tumeurs par les photosensibilisateurs, d'après [20]. **A**, tissu sain : vascularisation étanche, peu de macrophage et de fibre de collagène, vascularisation lymphatique. **B**, tissu tumoral : vascularisation fenestrée et anarchique, augmentation du nombre de macrophages et de molécules de collagène, absence de vaisseau lymphatique.

Cependant, même si le caractère hydrophobe des photosensibilisateurs peut apparaître comme bénéfique pour une accumulation intra-tumorale, cette caractéristique physicochimique a également pour conséquence l'agrégation du photosensibilisateur et sa capture par le système immunitaire non spécifique et le système réticulo-endothélial (SRE). De plus, leur agrégation induit une diminution de leur fluorescence et de la formation d' 1O_2 [13].

4. Système réticulo-endothélial

Le système réticulo-endothélial (SRE) est l'ancien terme désignant l'ensemble des cellules phagocytaires, d'origine mésenchymateuse, présentes dans les différents tissus de l'organisme. On distingue maintenant : les phagocytes issus des monocytes (macrophages résidents des tissus conjonctifs, de la rate, des ganglions lymphatiques, des alvéoles pulmonaires, du foie ou cellules de Kupffer) ; les cellules de soutien, à activité phagocytaire très faible (cellules réticulaires des organes hématopoiétiques, cellules endothéliales vasculaires, et fibroblastes).

Le système réticulo-endothélial correspond donc à une partie du système immunitaire en charge de l'élimination des corps étrangers (particules ou bactéries) et des cellules sanguines en fin de vie [22]. Au cours de leur transit, les corps indésirables sont opsonisés par les protéines du complément ou opsonines. Les cellules phagocytaires possèdent à leur surface des récepteurs spécifiques des opsonines activées. Après la reconnaissance des opsonines, la membrane plasmique des cellules phagocytaires va s'invaginer de manière à encapsuler la particule dans une vésicule appelée phagosome. Celle-ci fusionne alors avec un lysosome dont le contenu va dégrader la particule phagocytée. Les macrophages sont capables d'ingérer et de digérer des antigènes (Ag) exogènes tels que des micro-organismes entiers ou des particules insolubles.

Le SRE est composé d'organes richement vascularisés, contenant de nombreuses cellules phagocytaires [23], dont :

- Le foie. Il est fortement impliqué puisqu'une grande majorité des particules opsonisées sont phagocytées par les macrophages y résidant : les cellules de Kupffer. Ces cellules, qui se situent en contact avec la circulation sanguine au niveau des sinusoides du foie, représentent la moitié de tous les macrophages du corps humain.
- La rate. Elle est spécialisée dans la filtration et la capture des Ag amenés par le sang. Les Ag et les lymphocytes pénètrent dans la rate par l'artère splénique. De plus, la pulpe rouge splénique de la rate est constituée d'un réseau de sinus peuplés de macrophages capables de phagocyter les Ag apportés par le sang.

- Les ganglions lymphatiques. Ce sont des structures contenant un réseau réticulé rempli de lymphocytes, de macrophages et de cellules dendritiques. Groupés aux jonctions des vaisseaux lymphatiques, les ganglions sont la première structure lymphoïde organisée à rencontrer les Ag qui pénètrent dans les espaces tissulaires. Lorsque la lymphe passe à travers un ganglion, un Ag particulaire, apporté par la lymphe, sera capté par le réseau de cellules phagocytaires et de cellules dendritiques. L'architecture d'ensemble d'un ganglion lymphatique permet la réalisation d'un microenvironnement idéal pour que les lymphocytes puissent effectivement rencontrer les Ag captés et répondre.

5. Mécanismes de l'éradication tumorale post-PDT

La PDT peut induire une régression tumorale par l'action combinée de divers mécanismes : un effet direct de destruction des cellules tumorales, et des effets indirects, associant destruction des vaisseaux tumoraux (et régression consécutive de la tumeur par asphyxie) à une réponse inflammatoire et immunitaire de l'hôte.

On estime qu'il est nécessaire d'avoir une combinaison de ces effets pour le contrôle des tumeurs à long terme [5]. La prépondérance de l'un ou l'autre de ces effets va dépendre du type de tumeur, du photosensibilisateur (*e.g.* caractéristiques pharmacocinétiques, localisation intratissulaire et intracellulaire) et des conditions de PDT utilisées [24].

Pour résumer, trois mécanismes contribuant à l'éradication tumorale ont été identifiés (**Figure 7**) :

- un **effet direct** de destruction des cellules tumorales par nécrose, apoptose, autophagie ou sénescence ;
- un **effet indirect** par destruction de la vascularisation tumorale provoquant une privation de la tumeur en nutriments et oxygène et par conséquent, l'irradication tumorale ;
- un **effet indirect** par une réponse inflammatoire et immunitaire de l'hôte.

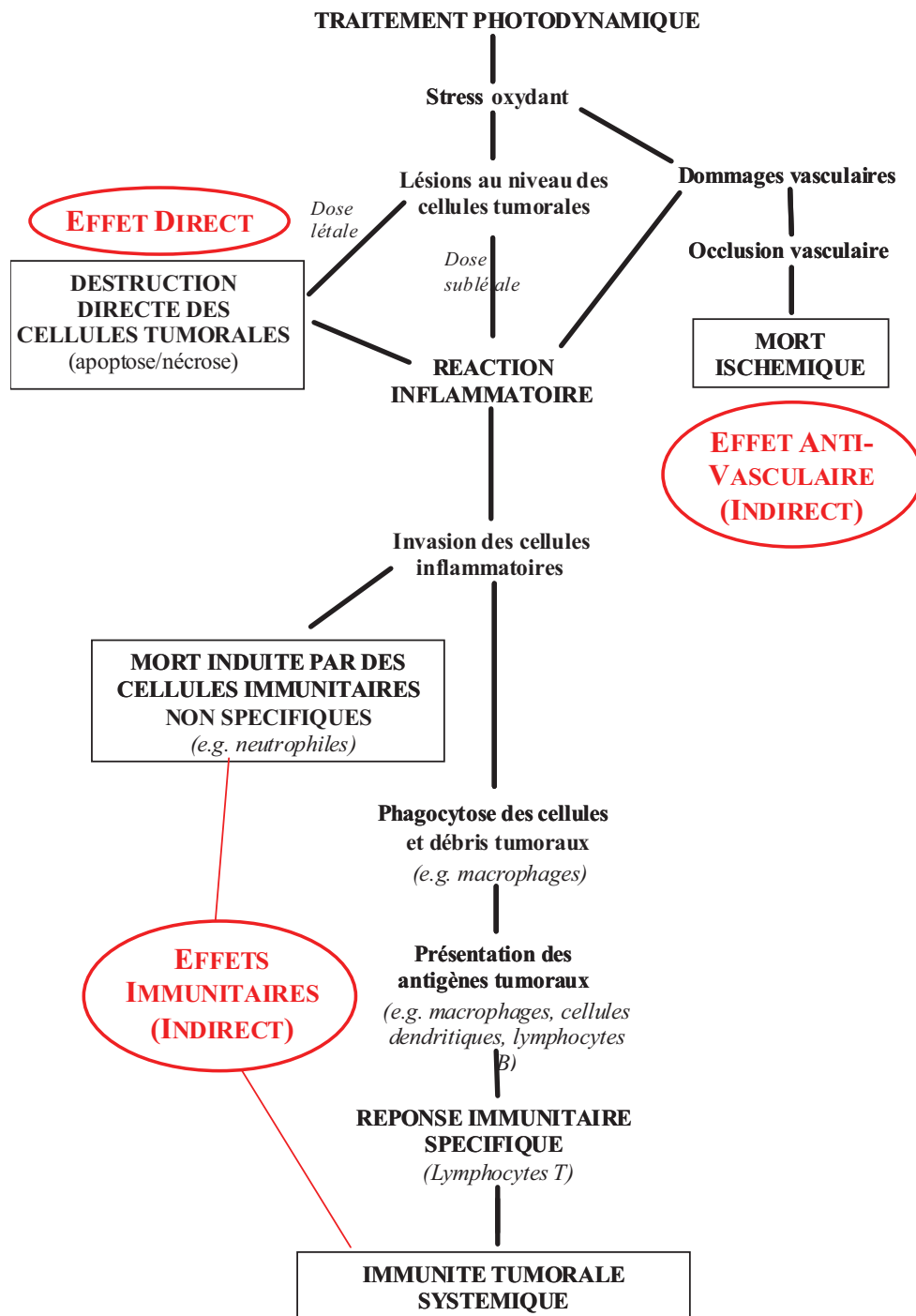


Figure 7 : Mécanismes de destruction tumorale associée à la PDT, adapté de [25]. Le traitement photodynamique induit un stress oxydatif au niveau des cellules tumorales et des cellules endothéliales vasculaires du tissu tumoral. Les dommages vasculaires ainsi engendrés conduisent à la destruction vasculaire du tissu tumoral et ainsi à l’asphyxie de la tumeur. D’autre part, les lésions directes induites aux cellules tumorales provoquent la mort de ces cellules. La nécrose des cellules tumorales, mais également les dommages aux cellules endothéliales vasculaires, provoquent l’activation du système immunitaire. Les macrophages activés sur le site tumoral phagocytent les débris cellulaires tumoraux et présentent leurs antigènes aux cellules de l’immunité spécifique.

a. Effets directs de la PDT

La PDT peut agir directement sur les cellules néoplasiques induisant plusieurs processus biologiques possibles conduisant à la mort cellulaire en fonction du type cellulaire, de la dose de lumière, notamment l'irradiance, de la localisation cellulaire du photosensibilisateur et de la concentration en O₂ [5, 24, 26].

- La nécrose est un processus biologique se traduisant par une forme violente et rapide de dégénération cellulaire classiquement caractérisée par le gonflement du cytoplasme, la destruction des organites et la rupture de la membrane plasmique, conduisant au relargage du contenu cellulaire et à une réaction inflammatoire tissulaire. Il s'agit d'une mort cellulaire non génétiquement programmée. En PDT, la nécrose est induite par une forte dose de photosensibilisateur et de lumière [27]. Lavie *et al.* ont montré qu'une forte irradiance en PDT inhibait l'apoptose en agissant sur les lamines nucléaires [27]. La localisation du photosensibilisateur au niveau de la membrane plasmique induit des photodommages membranaires caractérisés par une photo-oxydation des phospholipides membranaires. Cette perte ainsi générée de l'intégrité membranaire conduit à la nécrose de la cellule [28]. D'autres facteurs sont également importants pour la prévalence de la nécrose dans les cellules traitées par PDT, tels que la mutation de la protéine pro-apoptotique p53. Mikes *et al.* ont comparé la réponse post-PDT induite à l'hypéricine des lignées cellulaires HeLa et HT-29 [29]. La nécrose prédomine dans la lignée HT-29, exprimant une protéine p53 mutée. La lignée HeLa répond au traitement par l'induction de l'apoptose. Malgré cette différence de réponse, les deux lignées cellulaires présentent le même niveau de réponse au traitement.
- Contrairement à la nécrose, l'apoptose est une mort cellulaire dite génétiquement programmée, caractérisée par un rétrécissement cellulaire et un bourgeonnement de la membrane plasmique. La membrane plasmique et celle des organites maintiennent leur intégrité. Les cellules se fragmentent en vésicules qui sont ensuite phagocytées par les cellules du système immunitaire. Il n'y a donc pas de relargage du contenu cellulaire et de réaction inflammatoire *in vivo*. L'initiation du processus apoptotique nécessite la transcription de gènes spécifiques, l'activation d'endonucléases qui vont fragmenter l'ADN et l'activation de la voie des caspases. L'apoptose est déclenchée par des doses en PDT moins élevées que pour la nécrose [24, 30]. L'apoptose peut être induite par plusieurs voies de signalisation intracellulaire en fonction de la colocalisation cellulaire du

photosensibilisateur et des organites endommagés par les réactions de photo-oxydation [26] (**Figure 8**). Le photosensibilisateur peut se localiser au niveau de la membrane mitochondriale. Son activation conduit donc à la rupture de l'intégrité membranaire mitochondriale et donc au relargage dans le cytosol du cytochrome c qui va activer l'apoptosome et la procaspase 3 [31, 32]. Morris *et al.* ont montré que la phtalocyanine 4 (Pc4) induisait des photodommages aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL, contribuant ainsi à l'activation de l'apoptose [33]. De nombreuses équipes ont montré la relation entre la localisation des photosensibilisateurs au niveau du réticulum endoplasmique (RE) et l'activation de l'apoptose par l'intermédiaire des mitochondries [31, 34, 35]. Le stress photoinduit au niveau du RE conduit à la rupture de l'homéostasie du Ca^{2+} dans la cellule et à l'activation des voies de signalisation PERK et caspase 4 [34].

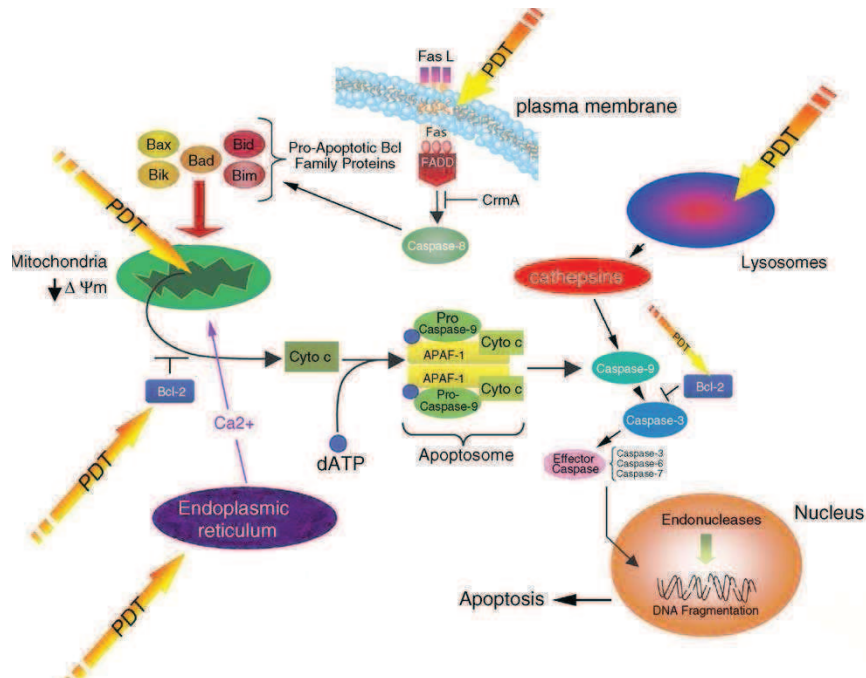


Figure 8 : Schéma non exhaustif des différentes voies de signalisation intracellulaire conduisant à l'apoptose après PDT, dépendamment de la localisation cellulaire des photosensibilisateurs, d'après [26]. En agissant au niveau de la membrane plasmique, la PDT active la protéine transmembranaire Fas qui recrute alors la protéine cytosolique FADD et active la voie de la caspase 8 [36]. La caspase 8 clive les protéines anti-apoptotiques et active les protéines pro-apoptotiques pour induire le relargage de cytochrome c de la mitochondrie. L'activation de photosensibilisateurs localisés dans la membrane mitochondriale conduit à la perte du potentiel membranaire mitochondrial et ainsi au relargage du cytochrome c. Le cytochrome c agit comme cofacteur de l'apoptosome, formé par les protéines Apaf-1 et caspase 9 et le nucléotide ATP, et qui participe à l'activation de la voie apoptotique des caspases 3, 7 et 6. D'autre part, le stress oxydatif induit par PDT au niveau du réticulum endoplasmique induit la libération de calcium qui augmente la perméabilité des pores de transition mitochondriaux [37]. De plus, l'activation des photosensibilisateurs fixés à la protéine anti-apoptotique Bcl-2 induit la dégradation de la protéine. Pour finir, la dégradation de la membrane lysosomale par PDT conduit à la libération de cathepsines, protéases lysosomales qui vont activer la caspase 9. Les caspases activées vont ensuite dégrader l'ADN et induire l'apoptose cellulaire.

- L'autophagie est également un processus de mort cellulaire génétiquement programmée mais contrairement à l'apoptose, les organites sont rapidement dégradés, les éléments du cytosquelette sont préservés et l'activation des caspases et la fragmentation de l'ADN apparaissent plus tardivement pendant le processus. Durant le processus, ce sont les autophagosomes qui phagocytent le cytoplasme de la cellule et le dégradent. Il n'y a donc pas de réaction inflammatoire [38]. De nombreuses études ont montré l'engagement dans le processus d'autophagie des cellules tumorales traitées par PDT [31, 32, 39]. L'autophagie a été décrite pour différents photosensibilisateurs et de nombreuses lignées cellulaires. Les ERO contribuant à l'activation du processus d'autophagie [40, 41], il n'est donc pas étonnant d'observer ce processus de mort cellulaire après PDT.
- La sénescence cellulaire est définie comme un programme physiologique d'arrêt du cycle cellulaire induit par le raccourcissement des télomères. Les cellules sont vivantes mais ne se divisent plus. Le terme de sénescence accélérée est attribué aux cellules en arrêt du cycle cellulaire causé par un stress oxydatif [42] ou des lésions à l'ADN. De nombreuses études ont montré un arrêt du cycle cellulaire des cellules traitées par PDT [32, 43-46]. Cependant, les auteurs n'ont pas identifié l'activité du marqueur classique de la sénescence : la β -galactosidase lysosomale.

La sensibilité des cellules à la PDT varie en fonction du type cellulaire ; ainsi les cellules lymphoïdes sont plus sensibles que les cellules épithéliales et les cellules d'origine mésenchymateuse [47, 48]. Cette différence de sensibilité intrinsèque est principalement due à l'engagement des cellules dans diverses voies de signalisation intracellulaire qui activent ou répriment la mort cellulaire [49], ainsi qu'aux différentes mutations rencontrées au niveau génétique et métabolique [24]. Contrairement à de nombreux agents cytotoxiques, la PDT induit la mort cellulaire à tous les stades du cycle cellulaire, et même pendant l'arrêt du cycle [50].

b. Effets vasculaires induits par PDT

Les cellules endothéliales ne semblent pas intrinsèquement plus sensibles à la PDT que d'autres types cellulaires mais en revanche, elles sont exposées à des doses de photosensibilisateur et d'O₂ plus conséquentes. Les effets vasculaires de la PDT sont multiples :

- Altération directe des cellules endothéliales. La PDT agit directement sur les cellules endothéliales ciblées, de la même manière que sur les cellules tumorales, conduisant à la mort cellulaire. L'altération des protéines du cytosquelette modifie la forme des cellules endothéliales qui s'arrondissent et se contractent [51]. L'interruption des jonctions cellulaires qui en résulte conduit à une augmentation de la perméabilité vasculaire, et donc à la fuite des éléments du sang hors des vaisseaux et à une diminution de la perfusion tumorale. Un oedème tissulaire est souvent observé [52].
- Thrombose. La mise à nue de la membrane basale associée à l'altération de l'endothélium va induire l'activation du facteur tissulaire et la mise en place de la cascade de coagulation. Au sein de notre équipe, Bechet *et al* ont montré une induction immédiate après PDT de l'expression protéique du facteur tissulaire, corrélée à une consommation de fibrinogène [52]. Il en résulte une réduction du diamètre luminal pour aboutir à une thrombose et une stase vasculaire [53]. Thomas *et al* ont démontré une diminution du flux sanguin tumoral post-PDT de 50% [54].
- Vasoconstriction. La PDT crée également une rupture de l'équilibre entre facteurs vasoconstricteurs et vasodilatateurs [5]. En effet, l'oxyde nitrique (NO) est un facteur vasodilatateur, anticoagulant, permettant d'éviter la thrombose des vaisseaux tumoraux. Son inhibition ou son relargage rompt l'équilibre préexistant au sein des vaisseaux tumoraux entre facteurs pro- et anti-coagulants [55].

L'occlusion vasculaire, engendrée par la thrombose et la vasoconstriction, induit la privation des cellules tumorales en O₂ et nutriments et conduit à la destruction tumorale.

Le degré de réponse vasculaire demeure fortement dépendant des conditions de traitement utilisées, en terme de dose de photosensibilisateur, d'IDL et de dose de lumière [56-58]. Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour potentialiser cet effet vasculaire de la PDT, soit en agissant sur le protocole de traitement, soit en utilisant des photosensibilisateurs ayant un mode d'action dit vasculaire c'est à dire une forte clairance plasmatique [59] (**Conf. PARTIE II, III.**).

c. Effets inflammatoires et immunitaires en PDT

La PDT induit une réponse immunitaire anti-tumorale à long terme. Le stress oxydatif induit par PDT déclenche l'activation d'une variété de signaux de transduction conduisant à la production de protéines de stress et de cytokines [5, 60]. Les réactions photochimiques de

type I et II induites par l'irradiation du photosensibilisateur conduisent à une photo-oxydation des lipides membranaires des cellules tumorales et des cellules endothéliales. Le relargage massif par les tissus lésés de ces fragments lipidiques conduit au recrutement et à l'activation des cellules effectrices de l'inflammation [61]. Ces événements ainsi que les dommages vasculaires et la libération de médiateurs de l'inflammation par les cellules nécrotiques induisent le chimiotactisme des cellules de l'immunité spécifique et non spécifique. Les cellules phagocytaires sont activées au niveau du site irradié afin d'éliminer les débris cellulaires post-PDT. Ces phagocytes peuvent ensuite agir comme des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Les épitopes présentés à leur surface, spécifiques de la tumeur, peuvent être reconnus par des lymphocytes T CD4+, conduisant à la génération de clones de lymphocytes T cytotoxiques qui vont détruire spécifiquement les cellules porteuses de ces épitopes. La réponse immunitaire qui s'en suit peut alors induire la destruction des cellules tumorales restantes et la prévention de métastases par le développement d'une réponse immunologique à mémoire [62, 63].

6. Applications cliniques en PDT

Les indications en dehors de la cancérologie concernent principalement la dermatologie, l'ophtalmologie mais également le diagnostic [64]. Du fait de l'utilisation d'une lumière peu pénétrante dans les tissus, la PDT est surtout appliquée actuellement pour des tumeurs accessibles directement (tumeurs cutanées) ou par voie endoscopique (œsophage, vessie), mais il est également possible de traiter des tumeurs solides (*e.g.* prostate, pancréas, foie, cerveau) en insérant les fibres optiques en surface de la tumeur ou directement dans celle-ci (PDT interstitielle). La PDT est actuellement utilisée en traitement curatif des cancers superficiels à des stades précoces ou en traitement palliatif (après échec de la radiothérapie et de la chirurgie). Un certain nombre de photosensibilisateurs sont actuellement en phase d'essai clinique ou ont obtenu l'AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) et/ou l'agrément de la FDA (Food and Drug Administration) (**Tableau I**).

Tableau I : Les photosensibilisateurs ayant une AMM ou l'agrément de la FDA, d'après [65].

Photosensibilisateur	Nom commercial	λ_{exc} (nm)	Indications
m-THPC	Foscan [®]	652	Cancers de l'œsophage, de la prostate, du pancréas, Tumeurs avancées de la tête et du cou
Verteoporphin	Visudyne [®]	689	Carcinomes basocellulaire et squameux
HPPH 2-(1-hexyloxyethyl)-2-divinylpyropheophorbide- α	Photochlor [®]	665	Carcinome basocellulaire, cancers de l'œsophage et cancer de la tête et du cou
Palladium-bacteriopheophorbide	Tookad [®]	763	Cancer de la prostate
5-ALA	Levulan [®]	630	Tumeurs de la peau, de la tête et du cou, tumeurs gynécologiques et carcinome basocellulaire
		375-400	Photodétection des cancers du cerveau, de la tête et du cou, des reins
Acide méthyl- δ -aminolévulinique	Metvix [®]	635	Carcinome basocellulaire
Acide benzyl- δ -aminolévulinique	Benzvix [®]	635	Tumeurs gastro-intestinales
Acide hexyl- δ -aminolévulinique	Hexvix [®]	375-400	Photodétection du cancer de la vessie
Lutetium(III)-texaphyrin ou Motexafin-lutetium	Lutex [®] , Lutrin [®] , Optrin [®] , Antrin [®]	732	Cancers de la prostate, du col de l'utérus, du sein et du cerveau
SnEt2 ou éthiopurpurine d'éthyle d'étain (IV)	Purlitine [®] , Photrex [®]	659	Sarcome de Kaposi, cancers du sein et de la prostate, carcinome basocellulaire
NPe6, mono-L-aspartyl chlorin e6, talaporfin sodium	Talaporfin [®] , Laserphyrin [®]	664	Tumeurs solides, cancer des poumons
BOPP, protoporphyrine borée	BOPP	630	Tumeurs cérébrales
Phtalocyanine zinguée	CGP55857	670	Carcinome squameux
Phtalocyanine de silicone	Pc4	675	Lésions cutanées et subcutanées de diverses tumeurs solides
Mélange de phtalocyanines sulfonées d'aluminium	Photosense [®]	675	Cancers de la peau, du sein, du poumon, du larynx, du col de l'utérus, de la tête et du cou, tumeur des yeux

En France, cinq photosensibilisateurs possèdent l'AMM :

- Le **Photofrin**[®], ou porfimer sodium, a obtenu l'AMM en 1996 pour traiter les rechutes de cancer du poumon non à petites cellules et de l'œsophage [10]. Comme expliqué dans le paragraphe I. 2., il s'agit d'un photosensibilisateur de 1^{ère} génération composé d'un mélange de monomère et d'oligomère de dérivés d'hématoporphyrine. Son temps de demi-vie plasmatique dans l'organisme est élevé, causant une photosensibilité cutanée pendant plusieurs semaines après le traitement [66]. En PDT, en plus des effets directs classiques, le Photofrin[®] induit également des dommages au niveau des cellules endothéliales vasculaires conduisant à une hypoxie, une thrombose et donc la nécrose des cellules tumorales par ischémie [67]. On observe également une inflammation locale associée à une réponse immunitaire [10]. En plus des pathologies pour lesquelles il a obtenu l'AMM, le Photofrin[®] est actif sur d'autres pathologies telles que le sarcome de Kaposi, l'oesophage de Barrett et le psoriasis [68].
- L'acide 5-aminolévulinique (ALA), commercialisé sous l'appellation **Lévulan**[®] (AMM en 2000) est principalement utilisé en dermatologie, en application locale suivie d'une irradiation pour traiter le psoriasis ou les kératoses actiniques [10]. L'ALA est un composé porphyrinique impliqué dans la biosynthèse de l'hème. Après métabolisation dans les mitochondries, l'ALA est transformé en une molécule photo-active, la protoporphyrine IX (PpIX), puis en hème. Selon son mode d'administration, l'IDL est compris entre 1h et 8h, et sa clairance plasmatique est rapide (48h). Le Levulan[®] induit donc peu de photosensibilisation cutanée, en revanche la profondeur de nécrose tumorale reste limitée à 1 mm et le traitement est considéré comme douloureux.
- Le **Metvix**[®] a obtenu l'AMM en 2000 pour le traitement des kératoses actiniques et carcinomes basocellulaires [10]. C'est un dérivé méthylé de l'ALA. Le Metvix[®] est déméthylé par les estérases intracellulaires des cellules cibles pour former l'ALA. Le cycle de l'ALA est ensuite entamé. Le Metvix[®] possède donc les mêmes propriétés photophysiques et pharmacologiques que le Levulan[®]. Le Metvix[®] présente un caractère plus lipophile, une meilleure sélectivité tumorale et induit une nécrose tumorale légèrement plus profonde que le Levulan[®] (> 2 mm) [10]. De plus, le traitement par Metvix[®] est moins algique que celui au Levulan[®] [10].

- La *méso*-(tétrahydroxyphényl)chlorine (*m*-THPC), commercialisée sous le nom **Foscan**[®] (AMM en 2002) est utilisée pour le traitement des cancers de la tête et du cou [10, 69]. Il s'agit d'un dérivé de chlorure, pur. Le Foscan[®] possède un rendement quantique de formation d'¹O₂ élevé. De faibles concentrations de Foscan[®] et de lumière sont suffisantes pour son activité photodynamique. Le Foscan[®] agit directement sur les cellules tumorales mais cause également des dommages vasculaires. La profondeur de nécrose des tumeurs traitées avec le Foscan[®] peut atteindre 1 cm [70]. Une étude a montré une accumulation sélective du Foscan[®] dans les cellules d'un implant orthotopique de tumeur cérébrale avec un rapport tumeur/tissu sain de 100/1 [71].
- La verteporphine, un dérivé de type benzoporphyrine monoacide (BDP-MA) commercialisé sous forme liposomale, sous le nom de **Visudyne**[®] (AMM en 2000), s'est avérée très efficace pour le traitement de la DMLA (dégénérescence maculaire liée à l'âge) dû à son haut potentiel d'accumulation dans les cellules endothéliales. Schmidt-Erfurth et Hasan ont réalisé une revue très intéressante sur les mécanismes d'action de la verteporphine [59]. La verteporphine est un composé chimiquement stable avec un rendement quantique de formation d'¹O₂ élevé. Cette molécule absorbe énormément dans les UVA et possède également un pic d'absorption entre 680 et 695 nm. Grâce à sa nature lipophile, la verteporphine se lie aux LDL. Les cellules endothéliales néoplasiques de la rétine surexpriment le récepteur aux LDL pour assurer l'apport en lipides nécessaires à leur croissance. La verteporphine est alors internalisée dans les cellules endothéliales néoplasiques causant la DMLA. La verteporphine est très rapidement éliminée de l'organisme, réduisant ainsi le risque de photosensibilisation cutanée et oculaire [59]. En effet, chez l'Homme, son temps de demi-vie plasmatique est de 5 à 6h [10].

II. Stratégies de ciblage en PDT

1. Ciblage passif

Le ciblage passif des photosensibilisateurs consiste à les vectoriser afin notamment d'améliorer leur biodisponibilité et biodistribution tumorale, de s'affranchir de la reconnaissance par le SRE, d'augmenter leur sélectivité tumorale et d'améliorer leur solubilité. Le *design* nanométrique (< 100 nm) des vecteurs ainsi que leur nature amphiphile peut rendre ces nanoobjets furtifs vis-à-vis du SRE [72, 73]. Cette furtivité permet de diminuer la clairance plasmatique des photosensibilisateurs et conduit donc à une modification des propriétés de transport des photosensibilisateurs vers le tissu tumoral. Néanmoins, les nano-vecteurs peuvent également engendrer une accumulation significative des composés photo-activables dans le tissu tumoral grâce à l'effet EPR (Enhanced Permeability and Retention) [74]. D'une façon générale, les vecteurs facilitent l'incorporation des photosensibilisateurs au sein du tissu tumoral. En PDT, les principaux types de vecteurs pouvant être utilisés sont : les liposomes, les nanoparticules biodégradables et non-biodégradables, les micelles et les dendrimères.

Ces systèmes vecteurs peuvent également être utilisés dans le cadre de stratégie de ciblage actif des cellules cibles. Il s'agit alors de fonctionnaliser les vecteurs par un « système » d'adressage (**conf PARTIE I, II. 2.**).

a. Liposomes

Les liposomes sont des vésicules biocompatibles et biodégradables, composées de phospholipides et de cholestérol organisés en monocouche ou bicouche lipidique, entourant un cœur aqueux (**Figure 9**). Le cholestérol apporte la rigidité à la membrane lipidique en réduisant sa perméabilité aux molécules encapsulées et en augmentant sa stabilité en présence de fluides. En PDT, les liposomes sont utilisés comme vecteurs de molécules photo-activables pour des administrations topique ou systémique. De façon schématique et simplifiée, la formulation topique facilite la pénétration cutanée du photosensibilisateur. La formulation systémique, quant à elle, permet d'encapsuler et de véhiculer les photosensibilisateurs dans une structure les protégeant ainsi de leur métabolisme plasmatique.

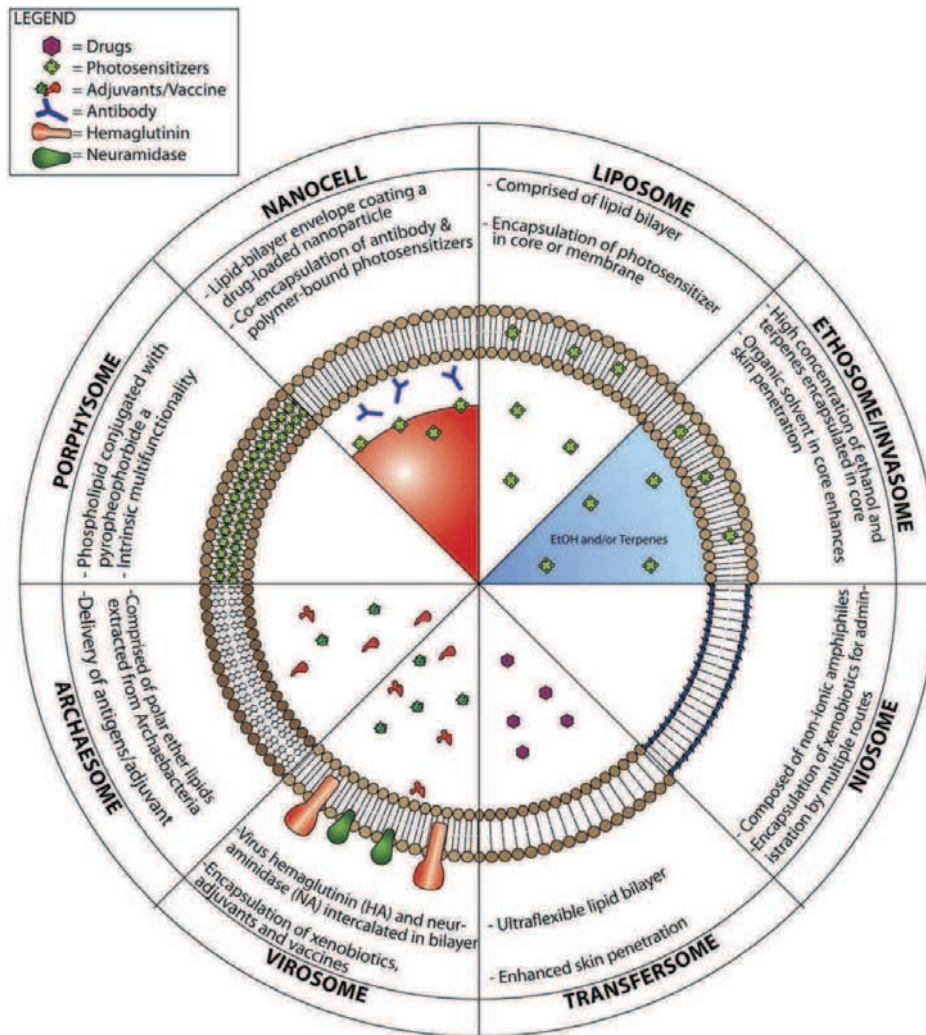


Figure 9 : Illustration schématique de nanostructures liposomales, d'après [75]. **Liposome :** vésicule de bicouche lipidique. **Nanocell :** nanoparticule contenue dans une vésicule de bicouche lipidique couplée au polyéthylène glycol (PEG). **Niosome :** vésicule de surfactants non ioniques et amphiphiles. Sa capacité de pénétration transépidermique est améliorée par comparaison à celle des liposomes. **Transfersome :** vésicule de bicouche lipidique rendue flexible par l'ajout de phosphatidylcholine éthanolique de germe de soja (SPC) et de détergents. Elle améliore la pénétration transépidermique de la molécule thérapeutique. **Virosome :** vésicule formée à partir d'une enveloppe virale. Elle contient les protéines virales de surface qui permettent l'adhésion de la vésicule aux récepteurs de la cellule cible. **Archaosome :** vésicule liposomale contenant les lipide-éthers polaires d'Archaeobactéries. Les vésicules marquées par les antigènes bactériens sont rapidement phagocytées par les cellules du système immunitaire et sont utilisées comme vaccins immunostimulants. **Porphyosome :** vésicule formée de phospholipides directement conjugués au pyrophéophorbide a. Ces pyro-lipides sont capables de s'assembler en structure liposomale. La forte densité de photosensibilisateur induit leur *quenching* de fluorescence. Après leur irradiation, l'énergie absorbée est rendue sous forme de chaleur. **Ethosome :** vésicule de bicouche lipidique renfermant dans son cœur une forte concentration en éthanol. L'éthanol possède la propriété d'améliorer la pénétration topique des liposomes [76]. **Invasome :** même vésicule que l'éthosome mais contenant en plus des terpènes.

En PDT, de nombreuses études ont été réalisées pour établir l'efficacité des liposomes comme vecteurs de photosensibilisateurs. Récemment, Nombona *et al.* ont montré que la phtalocyanine de zinc encapsulée dans des liposomes présentait *in vitro* une meilleure efficacité photodynamique par comparaison à la forme libre ou encapsulée dans des nanoparticules d'or [77]. Le Foslip[®] est la forme liposomale du Foscan[®], facilitant son administration par voie i.v. Entre autres, une étude a montré une différence du temps de vie de fluorescence entre le Foscan[®] et le Foslip[®] (6,6 ns *versus* 8,4 ns, respectivement), traduisant une différence de localisation cellulaire [78]. Les liposomes sont capables d'incorporer les photosensibilisateurs hydrophobes [79, 80]. Le cœur aqueux est également capable d'encapsuler des molécules chargées, solubles dans l'eau, telles que l'ALA et le bleu de méthylène [81, 82].

Les caractéristiques physico-chimiques des liposomes, telles que la taille, la nature des lipides, le ratio phospholipide/cholestérol [83, 84] et la charge de surface [85], vont influencer la circulation des liposomes dans le sang, la capacité de relargage, la localisation intracellulaire des photosensibilisateurs et donc l'efficacité thérapeutique en PDT [75].

Pour améliorer la pharmacocinétique et la distribution tumorale des liposomes, des molécules de carbohydrate ou de polymères hydrophiles peuvent être greffées à leur surface, telles que le polyéthylène glycol (PEG) et le monosialoganglioside (GM₁). Ces surfactants permettent d'éviter la reconnaissance des liposomes par les macrophages du SRE et la capture par ses organes constitutifs [86]. Ichikawa *et al.* ont montré une accumulation plus importante de photosensibilisateurs dans la tumeur lorsque les liposomes étaient PEGylés comparés aux liposomes non PEGylés [87]. Bovis *et al.* ont également montré l'avantage de la formulation PEGylées du Foslip[®] sur la pharmacocinétique et l'efficacité photodynamique du Foscan[®] [88].

Bien que la distribution tumorale des liposomes soit essentielle pour l'efficacité par PDT, le concept de libération du principe actif dans la cellule tumorale revêt toute son importance. Différents « systèmes » ont été référencés, soit dans le microenvironnement tumoral, soit dans la cellule tumorale après internalisation du liposome [75, 89]:

- liposomes sensibles au pH, activés par le pH plus acide du microenvironnement tumoral [90] ;
- liposomes fusionnant avec la membrane cellulaire par échange de lipides [91] ;
- liposomes sensibles aux enzymatiques, activés par des enzymes surexprimées au niveau tumoral [92] ;

- liposomes sensibles à la lumière, activés lors de la PDT [93] ;
- liposomes sensibles à la chaleur, activés par thérapie [94] ;
- liposomes sensibles aux ultra-sons [95].

Ces systèmes de relargage des photosensibilisateurs sont généralement sélectifs du site tumoral.

Les systèmes liposomaux présentent néanmoins l'inconvénient de pouvoir se fixer aux lipoprotéines de haut poids moléculaire (High Density Lipoprotein, HDL) et d'échanger des lipides, ce qui provoque leur désintégration. Le photosensibilisateur se retrouve ainsi libéré dans le compartiment sanguin [84]. Deux phénomènes interviennent : l'échange de phospholipides du liposome avec les apolipoprotéines des HDL, ou le passage des phospholipides du liposome vers les HDL, sans perte d'apolipoprotéine [96]. L'interaction des liposomes avec les HDL dépend des paramètres physicochimiques des liposomes (taille, charge, fluidité) [97].

b. Nanoparticules

Comme notre équipe l'a suggéré dans un article de revue paru en 2008, en PDT il est recevable de distinguer deux « types » de nanoparticules, les biodégradables et non biodégradables [98, 99].

Les nanoparticules biodégradables sont constituées de polymères qui ont la capacité d'être dégradés par hydrolyse ou par activité enzymatique dans un environnement biologique. Les polymères les plus utilisés sont l'acide lactique, peu hydrophile, et l'acide glycolique, très hydrophile [Poly(lactic-co-glycolic acid) ou PLGA]. C'est le ratio acide lactique/acide glycolique qui module la balance hydrophile-hydrophobe de la nanoparticule. Du fait de sa biocompatibilité, le polymère PLGA a été approuvé par la FDA (Food and Drug Administration) et l'Agence Européenne de Médecine pour son utilisation dans de nombreux systèmes vecteurs de médicaments chez l'Homme. Danhier *et al.* ont proposé une revue complète sur les nanoparticules de PLGA [100]. En PDT, un dérivé d'hypocrelline (SL052) encapsulé dans une nanoparticule PLGA a montré une meilleure efficacité anti-tumorale que le SL052 encapsulé dans un liposome ou dans une nanoparticule de polyvinylpyrrolidone (PVP) [101]. L'utilisation du bleu de méthylène pour l'éradication bactérienne de la plaque

dentaire par PDT a mis en évidence l'efficacité photodynamique de nanoparticules de PLGA [102]. Cette étude a également mis en exergue l'effet de la charge de surface des nanoparticules sur l'efficacité de relargage du bleu de méthylène. En effet, les nanoparticules de PLGA chargées positivement relarguent plus rapidement et en plus grande quantité le photosensibilisateur encapsulé. McCarthy *et al.* ont mis en évidence le *quenching* de la tetraphenylporphyrine (TPP) par des nanoparticules de PLGA puis sa photoactivation après internalisation cellulaire [103]. De nombreuses autres études ont mis en évidence l'efficacité des nanoparticules de PLGA dans le transport de photosensibilisateurs en PDT [104-106]. Bourdon *et al.* ont étudié la biodistribution et la pharmacocinétique de la *m*-THPC encapsulée dans des nanoparticules conventionnelles de polymères d'acide lactique (PLA) ou encapsulée dans des nanoparticules stabilisées avec du PEG (PLA-PEG) ou du poloxamer 188 (polox PLA) [107]. Une heure après son administration par voie i.v. chez la souris, la *m*-THPC encapsulée dans les PLA-PEG et polox PLA s'accumulaient en quantité moindre dans le foie que la *m*-THPC encapsulée dans les PLA (4% et 58% d'accumulation pour les PLA-PEG et polox PLA, respectivement, contre 100% d'accumulation pour les PLA). De plus, l'accumulation tumorale de la *m*-THPC est plus rapide lorsque le photosensibilisateur est encapsulé dans les nanoparticules stabilisées *versus* les nanoparticules dites conventionnelles.

Les nanoparticules non biodégradables présentent, quant à elles, de nombreux avantages [98]. Elles ne sont pas sensibles aux fluctuations usuelles de température et de pH. Leur taille, leur forme, leur porosité et leur dispersion peuvent être contrôlées pendant leur préparation. Ces nanoparticules sont résistantes aux attaques microbiennes et enzymatiques. Leur porosité (0,50 à 1,0 nm de diamètre) empêche la libération du photosensibilisateur mais permet la diffusion d'O₂ et d¹O₂ à travers la matrice de la nanoparticule. Les nanoparticules non biodégradables sont souvent utilisées comme des plateformes multifonctionnelles composées de différentes entités pour le diagnostic par imagerie, la PDT, le ciblage actif et la furtivité du système (**Figure 10**) [108-110]. De ces plateformes nanométriques multifonctionnelles, est apparu le terme « Theranostic » [111] qui définit un matériel combinant le diagnostic et la thérapie [112, 113].

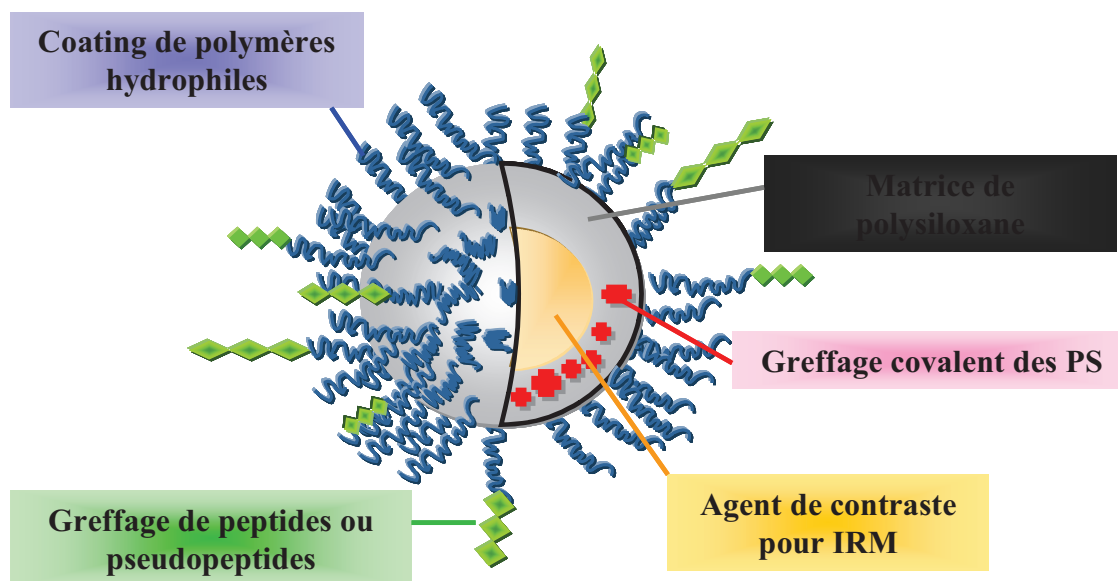


Figure 10 : Exemple de nanoplateforme multifonctionnelle pour la PDT suggérée par notre équipe, d'après [108]. Cette nanoparticule contient un cœur d'agent de contraste permettant d'estimer, par l'intensité de réhaussement du signal IRM, l'IDL optimal, la localisation de la fibre optique et l'extension réelle du volume tumoral. Les photosensibilisateurs sont conjugués par liaisons covalentes à la matrice en polysiloxane non biodégradable pour éviter leur agrégation. Le greffage de polymères hydrophiles sur la matrice rend la nanoparticule furtive, en plus de sa petite taille, et permet le greffage de molécules d'adressage telles que les peptides ou pseudo-peptides pour le ciblage cellulaire.

Plusieurs types de polymères peuvent composer le squelette des nanoparticules non biodégradables. Tang *et al.* ont encapsulé du bleu de méthylène dans des nanoparticules de polyacrylamide, préservant la structure chimique de l'agent photosensibilisant de l'activité des réductases [114]. Ces nanoparticules de polyacrylamide ont protégé le bleu de méthylène de sa modification chimique par des enzymes réductases *in vitro*. Cette équipe a également démontré l'efficacité anti-tumorale *in vitro* de ces nanoparticules après traitement photodynamique, permettant de confirmer la diffusion de l' O_2 et de l' 1O_2 à travers la matrice des nanoparticules de polyacrylamide. Dans notre équipe, Couleaud, Bechet *et al.* ont développé et testé une nanoparticule en polysiloxane multifonctionnelle permettant à la fois l'IRM de la tumeur et la PDT [108] (**Figure 10**). Le squelette en polysiloxane, non biodégradable, lie de manière covalente les molécules de chlorure. La nanoparticule est recouverte d'un polymère hydrophile (PEG) permettant sa furtivité et sa fonctionnalisation par le peptide ligand de NRP-1. Les nano-objets optimisés sont affins pour NRP-1 et conservent leur caractéristique photo-activable. Couleaud, Bechet *et al.* ont validé l'efficacité photodynamique *in vitro* des nanoparticules fonctionnalisées. L'efficacité photodynamique *in*

in vitro a été caractérisée par une DL_{50} de 3 et 5 J/cm^2 , respectivement pour les nanoparticules avec et sans peptides. Récemment, Gary-Bobo *et al.* ont développé une nanoparticule de silice mésoporeuse (diamètre des pores compris entre 2 et 20 nm) contenant de la camptothécine et une porphyrine [115]. Le photosensibilisateur a été covalamment lié à la silice, tandis que la camptothécine a été « chargée » dans les pores de la nanoparticule. Les auteurs ont montré *in vitro* que la nanoparticule était capable de libérer la camptothécine et d'assurer une efficacité photocytotoxique. En effet, après PDT avec les nanoparticules contenant la porphyrine et la camptothécine, le test de viabilité cellulaire a révélé 100% de mort cellulaire. Des nanoparticules métalliques ont également été développées, telles que des nanoparticules d'or [116] et des nanoparticules ferriques [117]. Ces nanoparticules métalliques ont été optimisées pour du « theranostic » [118].

c. Micelles

Les micelles polymériques sont composées d'un cœur hydrophobe de divers nature : polyester, poly(acides aminés), poly(meth)acrylate ou poly(acrylamide) et d'une couronne généralement constituée de polymères hydrophiles biocompatibles. Comparée à celle des liposomes, leur taille est souvent réduite, leur permettant d'exploiter l'effet EPR et d'éviter la reconnaissance par le SRE. De plus, les micelles sont décrites comme étant très stables dans les milieux aqueux [119]. Les micelles améliorent la solubilité des photosensibilisateurs, leur dispersion et leur internalisation cellulaire. Tu *et al.* ont montré une amélioration de la phototoxicité *in vitro* lorsque la chlorine e6 était encapsulée dans un système micellaire de calixarène-PEG [120]. Récemment, Tsai *et al.* ont réalisé une étude comparative de la protoporphyrine IX (PpIX) seule, *versus* encapsulée dans des micelles sensibles au pH (g-CIM) ou non (g-C) [121]. Ils ont d'abord observé une diminution de la cytotoxicité propre à l'obscurité de la PpIX encapsulée dans les deux types de micelles par comparaison à la PpIX seule. D'autre part, la localisation intracellulaire est apparue comme différente pour les deux types de micelles : g-CIM est localisée dans les endosomes, où le pH acide permet le relargage de la PpIX qui se relocalise ensuite au niveau nucléaire. Dans le cas de g-C, la PpIX n'est observée qu'au niveau des lysosomes. La biodistribution *in vivo* a, quant à elle, révélé une augmentation du temps de résidence plasmatique de la PpIX. Enfin, l'efficacité anti-tumorale est apparue augmentée avec l'encapsulation de la PpIX dans les micelles. Cette efficacité a été encore majorée avec les micelles sensibles au pH.

d. Dendrimères

Les structures dendrimériques ont également démontré un intérêt dans l'amélioration de l'efficacité photodynamique [122, 123]. Ces vecteurs font partie d'une classe de polymères présentant une structure extrêmement ordonnée, en forme d'arborescence. Ils possèdent une symétrie parfaite, une taille nanométrique et une cavité interne pouvant « contenir » la molécule d'intérêt [124]. Leur surface est fonctionnalisable par des molécules d'adressage. Les dendrimères sont des structures stables qui se comportent comme des micelles. Ils sont utilisés pour vectoriser des molécules actives, pour fonctionnaliser des molécules hydrophobes afin d'améliorer leur solubilité et d'éviter leur agrégation, mais également pour fonctionnaliser d'autres nanostructures telles que les nanotubes [123]. Selon les polymères utilisés, les dendrimères peuvent également permettre le *quenching* de photosensibilisateurs [125]. Les dendrimères représentent un système vecteur capable de libérer de manière spécifique et prolongée les photosensibilisateurs [126].

2. Ciblage actif

Pour améliorer la sélectivité du photosensibilisateur vis-à-vis du tissu cible, différentes molécules d'adressage ont été envisagées et conjuguées, soit directement à la molécule photo-activable, soit à des vecteurs. Nous avons rédigé ce chapitre de livre (page suivante) intitulé *Targeting strategies in photodynamic therapy for cancer treatment*, publié dans le livre *Advances in photodynamic therapy II* de Michael Hamblin et Pawel Mroz (Artech House, 2012), qui collige les principales stratégies de ciblage actif en PDT.

Le ciblage actif par des molécules d'adressage améliore la sélectivité cellulaire tumorale, l'incorporation cellulaire et la biodisponibilité tumorale des photosensibilisateurs. Parmi les molécules d'adressage décrites dans la littérature, on retrouve des aptamères de peptide ou d'oligonucléotide, des facteurs de croissance, des anticorps (Ac) ou fragments d'Ac, des transferrines, des folates, des peptides, etc... Ces différentes molécules d'adressage ont été choisies en fonction du phénotype de la lésion tumorale à traiter.

En PDT appliquée à l'oncologie, les stratégies de ciblage peuvent concerner la vascularisation tumorale de phénotype angiogénique ou les cellules néplasiques directement :

- Néovascularisation tumorale. Les principaux travaux concernent le ciblage des récepteurs au facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF), au facteur tissulaire et au facteur de coagulation VII, aux intégrines et aux métalloprotéinases matricielles.
- Cellules tumorales. Le ciblage des cellules tumorales est axé principalement sur des récepteurs (au facteur de croissance épidermique (EGF), aux LDL et cholestérol, aux oestrogènes, à l'acide folique, à la cholecystokinine A, à la gonadolibérine, aux transferrines, aux oligosaccharides) ou des Ag spécifiques du type tumoral.

Targeting Strategies in Photodynamic Therapy for Cancers Treatment

*Marlène Pernot^a, Céline Frochot^{b,d}, Régis Vanderesse^{c,d},
Muriel Barberi-Heyob^{a,d}*

^a Université de Lorraine, Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), UMR CNRS 7039, Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre-lès-Nancy, F-54500, France.

^{b,d} Université de Lorraine, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), UPR 3349, Nancy, F-54000, France

^c Université de Lorraine, Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), UMR CNRS 7568, Nancy, F-54000, France

^d GDR CNRS 3049 "Médicaments Photoactivables-Photochimiothérapie (PHOTOMED)"

Introduction

The selective targeted delivery of photosensitizers to diseased cells is one of the major problems in PDT and is still a challenge to take up. One area of importance is the elaboration of targeted photosensitizers. Targeted therapy is a new promising therapeutic strategy, created to overcome growing problems of contemporary medicine, such as drug toxicity and drug resistance. An emerging modality of this approach is targeted photodynamic therapy (TPDT) with the main aim of improving delivery of photosensitizer to cancer tissue and at the same time enhancing specificity and efficiency of PDT. Depending on the mechanism of targeting, we can suggest to divide the strategies of TPDT into "passive", "active" and "activatable", where in the latter case the photosensitizer is activated only in the targeted tissue. In this review, contemporary strategies of TPDT are described, including new innovative concepts, such as targeting assisted by peptides and aptamers, multifunctional nanoplateforms with navigation by magnetic field or "photodynamic molecular beacons" activatable by enzymes

and nucleic acid. The imperative of introducing a new paradigm of PDT, focused on the concepts of heterogeneity and dynamic state of tumor, is also called for.

In this sense, to overcome the drawbacks encountered in passive photosensitizer targeting, an arsenal of targeting strategies have been recently developed, including conjugated organic molecules as well as supramolecular carrier platforms like dendrimers, micelles, liposomes and nanoparticles. Numerous interesting works have clearly demonstrated that more specific drug targeting, cellular uptake and bioavailability can be achieved by binding various ligands, known as targeting moieties, to the photosensitizers or to the surface of the carrier platforms, such as peptides, growth factors, transferrin, antibodies or antibody fragments, oligonucleotide aptamers and small compounds such as folate. The rationale of all these strategies is taken from biologic and molecular characteristics of tumor tissues. For instance, alterations or increased levels in receptor expression of specific cellular type occur in diseased tissues.

These active-targeting approaches may be particularly useful for vascular-targeted PDT (VTP). Indeed, VTP effects are mediated not only through direct killing of tumor cells but also through indirect effects, involving both initiation of an immune response against tumor cell antigens and destruction of the tumor vasculature.

This chapter will describe recent and significant advances and developments in strategies for achieving selective enhanced photosensitizer concentration in neoplastic target tissue with the emphasis on target specificity. Description is focused on the recent and significant published articles describing the different targeting strategy and references of related reviews will be indicated.

I. Biodistribution and Natural Selectivity of Photosensitizers

PDT has inherent dual selectivity due to the control of light delivery and to some extent selective photosensitizer accumulation in tumors. Biodistribution and cellular incorporation of photosensitizers depend partly on the interactions between these molecules and transport molecules in plasma. Most photosensitizers when injected into the blood circulation behave as macromolecules either because they are bound to large protein molecules or because they have formed intermolecular aggregates. It is thought that the increased vascular permeability to macromolecules typical of tumor neovasculature is responsible for the preferential extravasation of the photosensitizer in tumors. In addition, it is thought that tumors have poorly developed lymphatic drainage, and those macromolecules,

which extravasate from the hyperpermeable tumor neovasculature, are retained in the extravascular space. This means that therapeutic agents that gain interstitial access to the tumor present higher retention times than normal tissues. The combination of leaky vasculature and poor lymphatic drainage, which characterise tumor vasculature, result in the so-called Enhanced Permeation and Retention (EPR) effect¹. The effectiveness of PDT is widely determined by the efficiency of the local generation of $^1\text{O}_2$, the degree of efficiency and selectivity to which therapeutic concentrations of the photosensitizer is delivered to the target site with minimal uptake by non-target cells and subsequent localized light irradiation.

II. Tumor Neovascularisation Targeting

The targeting of tumor vasculature has become a large area of focus for the development of new cancer therapeutics. It is known that when a tumor grows, its need for nutrients and oxygen increases, and thus the number and size of blood vessels increase proportionately. This phenomena is angiogenesis. By attacking the growth of the neovasculature, the size and the metastatic capabilities of tumors can be regulated. Tumor neovasculature targeting appears as an approach of significant research interest for the development of active photosensitizer delivery systems able to enhance selectivity and efficiency of vascular PDT for cancer treatment. The main molecular targets explored in the vascular-targeting PDT for cancer includes the vascular endothelial growth factor receptors (VEGFRs such as neuropilin-1 (NRP-1)), receptor tissue factor (TF), $\alpha_v\beta_3$ integrins, and matrix metalloproteinase (MMPs) activities.

A. *Vascular Endothelial Growth Factor Receptors*

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most potent direct-acting angiogenic proteins known. This growth factor is upregulated in the majority of neoplastic cells, mainly as a response to hypoxia and many oncogens, and its overproduction is correlated with high microvascular density and poor prognosis. The overexpression of VEGF results in the upregulation of VEGFR-1 (also known as fms-like tyrosine kinase (flt-1)) and VEGFR-2 (foetal liver kinase-1, flk-1 or KDR (kinase domain region)). VEGFR-2 is generally believed to be the main receptor that mediates VEGF biological activities and plays a major role in tumor-associated angiogenesis. It is highly expressed on endothelial cells in tumor neovasculature. Therefore, VEGFR-2 is seen as an interesting molecular target for anti-

angiogenic drug delivery, and specific targeting of VEGFR-2 could provide a promising approach for selective and efficient photosensitizer delivery to tumor neovasculature.

Although targeting VEGFR-2 has been widely investigated for the selective delivery of therapeutic drugs for conventional therapies such as radiotherapy, a limited number of papers have been published for the selective delivery of photosensitizers. Renno *et al.* have showed that PDT using verteporfin conjugated to a peptidic motif (ATWLPPR) known to bind VEGFR-2 was more effective in causing choroidal neovascularization closure than untargeted verteporfin. As expected targeted verteporfin also resulted in more selective treatment than untargeted drug². These studies suggest that targeting VEGFR-2 can be an effective approach to confine sufficient doses of photosensitizers within the tumor neovasculature and thus potentiate the vascular photodynamic effect with minimal side effects. Our group demonstrated in agreement with others^{3,4} that this peptide targeted NRP-1 and not KDR. Although VEGFR-2 still a potential target to explore, the latter observations have then attracted a great interest on the potential of NRP-1 as promising target for targeted vascular PDT.

Neuropilins (NRP) have also been identified as receptors for the VEGF₁₆₅ isoform. The transmembrane protein NRP-1 has been described as a positive modulator of VEGFR-2 and is thereby a crucial inducer of angiogenesis. Neuropilins are expressed specifically in tumor angiogenic vessels and some tumor cells, and promote tumor angiogenesis and progression. Hence, targeting NRP-1 can lead to the selective vascular localization of photosensitizers, and thus enhance the vascular photodynamic effects. The conjugation of a photosensitizer (5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin (TPC)) to the heptapeptide ATWLPPR has been described by our group. Our group evidenced *in vitro* by competition experiments in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC)⁴ and *in vivo* by biodistribution studies in nude mice xenografted with U87 human malignant glioma cells that a part of the accumulation of the conjugated photosensitizer (noticed TPC-Ahx-ATWLPPR) was related to NRP-1-dependent mechanisms but also to non-specific mechanisms. Taking advantage of RNA silencing techniques known as RNA interference, we have selectively silenced NRP-1 expression in MDA-MB-231 breast cancer cells to provide the evidence for the involvement of NRP-1 expression in the conjugate cellular uptake. We also observed *in vivo* the vascular effect by measuring the tumor blood flow during PDT using both conjugated and nonconjugated PS. The conjugate-mediated vascular targeted PDT produced a selective vascular effect, leading to vascular shutdown and tumor growth delay^{5,6}. From the biological mechanism point of view, the conjugate-mediated vascular effect implies the induction of

tissue factor (TF) protein expression that may lead to the thrombogenic effect within the vessel lumen. Nevertheless, affinity for NRP-1 remains low probably due to (i) intramolecular interactions between chlorin and peptide, steric hindrance due to the TPC moiety, (ii) aggregation of the photosensitizer molecules, (iii) low stability of the peptide moiety that, may be due to sensitivity to circulating peptidases action. To improve our system, multifunctional nanoparticles as photosensitizer carriers have been developed⁷.

B. *Tissue Factor & coagulation factor VII*

Tissue factor (TF) is a cell membrane-bound glycoprotein and a member of the class 2 cytokine receptor family. It is composed of a hydrophilic extracellular domain, a membrane-spanning hydrophobic domain, and a cytoplasmic tail of 21 residues, including a non-disulfide-linked cysteine. TF forms a high-affinity and specific complex with its endogenous ligand, coagulation factor VII (FVII), as the initial step of the blood coagulation pathway [Nemerson, 1988]. Accumulating evidence suggest that TF is aberrantly overexpressed by angiogenic vascular endothelial cells and various tumor cells⁸ but not on endothelial cells of normal blood vessels. Several studies have generated promising results in inhibiting tumor growth in animal models by targeting TF. Moreover, it has been suggested that VEGF protein secreted by tumor cells induces endothelial cells in tumor vasculature to overexpress TF. All the aforementioned characteristics suggest that TF can serve as specific therapeutic target for targeted drug delivery directed at tumor angiogenesis. Accordingly, several methods have been developed for selectively delivering drugs to TF-expressing tumor vasculature and tumors using FVII as a drug carrier. An immunotherapy strategy for destroying the tumor vasculature by targeting TF on tumor vascular endothelial cells with an immunoconjugate (icon) molecule has been described. More recently, this group has described an approach targeting TF on tumor cells and angiogenic vascular endothelial cells by FVII-targeted verteporfin PDT for breast cancer *in vitro* and *in vivo*. Authors demonstrated that (i) FVII protein could be conjugated with verteporfin without affecting its binding ability; (ii) FVII-targeted PDT could selectively affect TF-expressing cells and VEGF-stimulated angiogenic human endothelial vein endothelial cells (HUVEC) but no side effect was observed on non-TFR expressing unstimulated cells; (iii) fVII targeting enhanced the effect of verteporfin PDT by three to four-folds; (iv) fVII-targeted PDT induced significantly stronger levels of apoptosis and necrosis than non-targeted PDT; and (v) FVII-targeted PDT had a significantly stronger effect on inhibiting breast tumor growth in mice than non-targeted PDT [Hu *et al.*

2010]. Since receptor TF is expressed on many types of cancer cells and selectively on angiogenic vascular endothelial cells, these findings suggest that FVII-targeted PDT could have broad therapeutic applications. Cheng *et al.* demonstrated that *in vivo* administration of FVII targeted PDT significantly inhibited or eliminated subcutaneous A549 and H460 tumor xenografts in an athymic nude mouse model without any obvious side effects, concluding that this targeting strategy could be effective and safe for the treatment of human lung cancer in preclinical studies.

C. Integrin $\alpha_v\beta_3$

The $\alpha_v\beta_3$ -integrin is highly expressed on neovascular endothelial cells and is important in the calcium-dependent signalling pathway, leading to endothelial cell migration. It is also overexpressed in many tumor cells but also in actively proliferating endothelial cells and around tumor tissues. Moreover, $\alpha_v\beta_3$ -integrin is an endothelial cell receptor for extracellular matrix proteins harboring the RGD peptidic sequence. Therefore, $\alpha_v\beta_3$ -integrin is considered as an attractive molecular target for antivascular therapies. In accordance with this, several investigations have described the potential of such receptors in vascular-targeted PDT. Chaleix *et al.* reported the solid-phase synthesis of four porphyrins bearing the $\alpha_v\beta_3$ -integrin ligand RGD (H-Arg-Gly-Asp-OH) tripeptide⁹. Three of the conjugates prepared displayed photodynamic activity on the K562 leukaemia cell line to a degree comparable to that of Photofrin II[®]. The authors later described the synthesis of a cyclic peptide containing the RGD motif and adopting conformations showing an increased affinity for integrins. To increase the selectivity of phthalocyanines, Allen *et al.* have evaluated the use of viral proteins to deliver the photosensitizer to the selected tissue¹⁰. Adenoviruses cause illnesses such as gastroenteritis, conjunctivitis and respiratory diseases. They have received a great deal of attention as gene therapy vectors. Adenoviruses efficiently break the endosomes upon infection in the cell and therefore, it was anticipated that adenovirus-photosensitizer dyads would target the cell nucleus more quickly than free photosensitizer. This targeting of the nuclear cell resulted in a 2.5 fold increase of the photodynamic activity of photosensitizer in comparison with a cytoplasmic localization. Adenovirus penton base proteins contain the RGD peptide sequence motif. Adenoviruses type 2 structural proteins; the hexon, penton bases and fiber antigen were isolated and purified. The adenovirus tetrasulfonated aluminum phthalocyanine derivatives were tested both *in vitro* and *in vivo*. The penton base conjugate was the most efficient *in vitro*, as measured in two positive cell lines (A549, Hep2) expressing

integrins¹⁰. According to this study, it appears that adenoviral proteins can be used to target tumor cells. Despite a non-optimal photodynamic activity, *in vivo* results were encouraging. Nevertheless, tumor targeting using adenoviral protein vehicles may promote inflammation and anti-protein cellular immunity, which could limit their usefulness.

Our group conjugated a photosensitizer (5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin or porphyrin) to the RGD motif as a common sequence¹¹. We reported an efficient solid-phase synthesis of a new family of peptidic photosensitizers with linear or cyclic [RGDfK] RGD motif. Chlorins containing linear and constrained RGD motif were incorporated up to 98- and 80-fold more, respectively, than the unconjugated photosensitizer over a 24 h exposure in HUVEC overexpressing $\alpha_v\beta_3$ integrin. Peptidic moiety also led to a non-specific increased cellular uptake by murine mammary carcinoma cells (EMT-6), lacking RGD binding receptors. The higher photodynamic efficiency was related to conjugates greater cellular uptake. Survival measurements demonstrated that HUVEC were greatly sensitive to conjugates-mediated photodynamic therapy. This study also showed that peptidic moiety was obviously an interesting means to introduce such a balance between hydrophilicity and hydrophobicity. More recently, we described the synthesis, characterization, fluorescence, and singlet oxygen quantum yields of tetraphenylporphyrin and tetraphenylchlorin coupled to RGD type peptides. They reported that some of these compounds are very promising for potential PDT applications¹².

D. *Matrix Metalloproteinases (MMPs)*

Tumour-associated proteases are known to function at multiple steps of tumour progression, affecting tumour establishment, growth, neovascularization, intravasation, extravasation, and metastasis. Proteolytic degradation of the extracellular matrix (ECM) is crucial for cancer development, invasion and metastasis, all of them associated with increased activities of several different protease families^{13,14}. Numerous studies have documented increased expression of proteases such as MMPs in many human malignant tissue types. Thus, protease-sensitive macromolecular prodrugs have attracted interest for bio-responsive drug delivery to disease sites with up-regulated proteolytic activities, and many strategies emerged from protease targeting to convert inactive PDT prodrug into active drug when activated *in vivo*¹⁵. In fact, the tumor-associated proteases could act as activators of the protease-mediated PDT agent.

MMPs are tumor promoting enzyme playing an important role in angiogenesis¹⁶⁻¹⁸ and thus are potential interesting target in PDT. Prodrugs activated by proteases are not recent but applied to PDT, proteases become attractive biological triggers in drug development to control $^1\text{O}_2$ production; many strategies emerged from protease targeting to convert pharmacological inert prodrug into active pharmacophore when activated *in vivo*¹⁵.

As most photosensitizers used in PDT are porphyrins derivatives that absorb light energy and then transfer to oxygen or emitted fluorescence, it has been reported that $^1\text{O}_2$ generation is closely correlated with fluorescent intensity of the photosensitizing agent. So, when a photosensitizer is in a fluorescent quenched state, its ability to generate $^1\text{O}_2$ is also reduced. Molecular beacons are FRET-based target-activatable probes, offering control of fluorescence emission in response to specific targets such as proteases, as a useful tool for *in vivo* cancer imaging. By combining the two principles of FRET and PDT, Zheng *et al.* suggested a concept of photodynamic molecular beacon for controlling the photosensitizer's ability to generate $^1\text{O}_2$, and thus, for controlling its PDT activity. They described the synthesis and characterization of a MMP7-triggered photodynamic molecular beacon, using (i) pyropheophorbide as the photosensitizer (PS) ; (ii) black hole quencher 3 (Q) as a dual fluorescence and $^1\text{O}_2$ quencher; and (iii) a short peptide sequence, GPLGLARK, as the MMP7-cleavable linker. The photosensitizer and the quencher are attached to the opposite end of the MMP7-specific cleavable peptide linker to keep them in close proximity, enabling FRET and $^1\text{O}_2$ quenching to form inactive prodrug. Thus, the photosensitizer's photoactivity is silenced until the linker interacts with the target tumor-associated MMP7.

After validating the MMP7-triggered production of $^1\text{O}_2$ in solution, the authors demonstrated the MMP7-mediated photodynamic cytotoxicity in cancer cells. *In vivo* studies also revealed the MMP7-activated PDT efficacy¹⁹.

III. PDT - Neoplastic Cells Targeting

This second part deals with photosensitizers covalently bound to different biomolecules (sugars, steroid hormones, amino acids, proteins...), *via* a direct coupling or using linkers/spacers. These biomolecules, as targeting moieties are used to direct the photosensitizing agents against neoplastic cells-associated specific antigens. The coupling of a vector can either *i)* modulate the amphiphilicity and enhance the solubility of these compounds in biological media and prevent self-aggregation (passive targeting), or *ii)* promote cellular recognition (active targeting), with the aim to increase the biological

efficiency. Several of these targeting strategies offer the advantage of transporting the photosensitizer across the cellular plasma membrane, resulting in intracellular accumulation of the photosensitizers, which may allow for targeting photosensitive intracellular sites, and thus improve photodynamic efficiency.

A. Epidermal Growth Factor (EGF)-receptors

The ligands that bind the EGF receptor (EGFR HER) include EGF, transforming growth factor- α (TGF α), heparin-binding EGF-like growth factor, amphiregulin (AR), betacellulin (BTC), epiregulin (EPR), and epigen. Each of the nature peptide growth factors is characterized by a consensus sequence consisting of six spatially conserved cysteine residues. This consensus sequence is known as the EGF motif and is crucial for binding members of the HER receptor tyrosine kinase family. In addition to binding EGFR, HB-EGF, BTC, and EPR are also reported to bind HER4. Since a high EGF receptors expression frequently accompanies development of several tumor types such as squamous carcinomas, its natural ligand EGF was an attractive candidate for the conception of drug targeting strategies. One binding to its receptor, EGF is internalized in the cell through receptor-mediated endocytosis, enabling the intracellular accumulation of photosensitizers. Based on this concept, EGFR receptors provide an interesting approach for selective photosensitizer delivery to tumor tissues.

Lutsenko *et al.* conjugated EGF with aluminum and cobalt disulfonated phthalocyanines, the EGF:photosensitizer *ratio* being 1:1[Lutsenko *et al.* 1999]. EGF-phthalocyanines exhibited a much higher photoactivity than their nonconjugated analogous. The antitumor activity was also investigated *in vivo* on the growth of solid tumors (murine melanoma cells line B16) implanted in mice. The administration of the conjugate strongly increased mean life spans and mean survival time of animals bearing tumors whereas free phthalocyanines described practically no effect on these parameters²⁰.

Targeting the EGFR with antibody (Ab)-delivered photoactive molecules may serve as a two-armed feedback-controlled approach: the photoactivatable compound together with illumination may target and destroy the EGFR, and the fluorescent dye may allow the progress of the treatment to be monitored. Soukos *et al.* studied an anti-EGFR monoclonal (m)Ab (C225) coupled to either the near-infrared fluorescent dye *N,N'*-di-carboxypentyl-indodicarbocyanine-5,5'-disulfonic acid (indocyanine Cy5.5) for detection or a photochemically active dye (chlorin₆₆, Ce6) for therapy: (1) to determine whether the intra-

venous injection of a conjugate between C225 and the fluorescent dye indocyanine Cy5.5 could deliver sufficient amounts of the fluorophore into clinically unrecognizable early premalignant lesions and, (2) to test the photodynamic effect of a conjugate between C225 and Ce6²¹. Authors demonstrated that immunophotodiagnosis using C225-Cy5.5 conjugate might have potential both as a diagnostic modality for oral precancer and as a surrogate marker. As suggested, the use of a NIR emitting fluorophore as a label may be an alternative to use radioisotopes, with consequent increased patient safety. To extend the analogy with radioisotopes, the principle of using an anti-EGFR mAb to deliver photoactive molecules applies equally well to therapeutic photosensitizers as to fluorophores, and furthermore, immunophotodiagnosis can be used to assess response. HER2, also called human EGF receptor-2, is highly upregulated target on tumor cell surfaces such as breast cancer. Bhatti *et al.* described complex of multiple photosensitizers (verteporfin or pyropheophorbide-a) with anti-HER2 single chain Fv (scFv). They demonstrated that the photoimmunoconjugates were more potent than either free photosensitizer, effectively killing tumor cells *in vitro* and *in vivo*. *In vivo* treatment with the photoimmunoconjugate comprising an anti-HER2 scFv with about 8-10 molecules of the pyropheophorbide-a led to a significant tumor regression²². It is important to note that the clearance of the immunoconjugate was still more rapid than free pyropheophorbide-a, suggesting that the time from administration of scFv-pyropheophorbide-a to exposure to laser light could be therapeutically attractive with very little danger of skin photosensitivity.

Selbo *et al.* have explored the possible cell population inactivation by PCI (photochemical internalization) of the EGFR-targeted protein toxin EGF-saponin²³. A wide range of anti-cancer drugs are substrates of the ATP-binding cassette transporter ABCG2/CD338/BCRP/MXR, which is thought to play an important role in multi-drug resistance (MDR) and protection of cancer stem cells against chemotherapeutics and PDT. In this interesting study, the authors demonstrated that strong amphiphilic PCI-photosensitizers, including a chlorine, a porphyrin and a phthalocyanine are not substrates of ABCG2 using the MA11 cell line as a novel MDR model. As proof-of-concept, the authors also show that PCI of targeting toxins is a highly potent strategy for the site-specific elimination of EGFR-expressing MDR cells.

B. Cholesterol and Low Density Lipoprotein (LDL)

The steroid hormones are an interesting class of biomolecules to target photosensitizers to cancer cells. In particular cholesterol is a vital component of eukaryotic cell membranes and can be taken up quickly by cancer cells. It thus appears that the covalent coupling of cholesterol to a molecule could favour its association with LDL and increase its photodynamic efficiency. Furthermore axial substitution of suitable central metals (Si, Ge, Al) by cholesterol, which is a lipophilic and bulky ligand, could decrease phthalocyanine self-aggregation (inhibition of the π - π -stacking by addition of steric hindrance on the sides of the macrocycle) and increase the crossing of the lipophilic membrane. Photodynamic activities of cholesterol-phthalocyanine derivatives were investigated on two pigmented melanoma cell lines: M3Dau and SK-MEL-2²⁴. M3Dau cells were of interest as they led to melanoma tumors in nude mice, allowing further *in vivo* validations. SK-MEL-2 cells were also used in order to elucidate whether the photocytotoxicity of the phthalocyanines could vary depending on the pigmented melanoma cell line used. Segalla *et al.* demonstrated that cholesterol-phthalocyanine derivatives, injected systemically into mice bearing an intramuscularly implanted MS-2 fibrosarcoma, was quantitatively transferred to serum lipoproteins and localized into the tumor tissue. The selectivity of tumor targeting was similar to that observed for other liposome-delivered phthalocyanines²⁵. Another grafting of cholesterol was achieved by Maree *et al.*²⁶. The authors showed that unfortunately the conjugate was highly aggregated at low concentrations. No biological evaluation was performed on this compound yet.

LDLs have been suggested to be able to play an important role in transport and release of photosensitizers in tumor cells. A *plethora* of studies have showed that photosensitizers such as phthalocyanine, Visudyne[®] and chlorin e6 mixed with LDL before administration led to an increase in photodynamic efficiency²⁷. Zheng and co-workers prepared a delivery system comprising a pyropheophorbide cholesterol oleate photosensitizer incorporated into LDL with a modest photosensitizer payload. Interestingly, laser scanning confocal microscopy studies demonstrated that such a LDL-based photosensitizer was internalized exclusively by LDL receptors overexpressing human hepatoblastoma G2 (HepG2) tumor cells²⁸. To reduce the dose for more efficient cancer detection and treatment, Li *et al.* designed a novel strategy to improve LDL's photosensitizer payload using a silicon-phthalocyanine as new NIR dyes. The choice of such compound was based mainly on the fact that the central silicon atom of silicon-phthalocyanine allows axial coordination of two bulky

ligands on each side of the phthalocyanine ring to prevent stack aggregation usually encountered in solution for the planar molecular structure; since such aggregation is thought to be the major limiting factor for achieving high probe/LDL payload. Confocal microscopy studies demonstrated that the internalization of the conjugate by human HepG2 cells was still mediated by LDL receptors pathway. Using clonogenic assay, the *in vitro* PDT response of HepG2 cells revealed a significant enhanced efficacy of LDL receptors-targeted PDT²⁹. More recently, Song *et al.* described the preparation and characterization of the naphthalocyanine reconstituted LDL nanoparticles as well as the *in vitro* and *in vivo* validation of the LDL receptors-targeting of the conjugate to cancer cells and in mice bearing human HepG2 tumors. A confocal microscopy study revealed that the photosensitizer reconstituted LDL nanoparticles retain their LDL receptors-mediated uptake by cancer cells. Its preferential uptake by tumor *vs.* normal tissue was also confirmed *in vivo* by non-invasive optical imaging technique³⁰.

C. Oestrogen Receptors

To improve the uptake of the phthalocyanine derivatives by receptor-rich endocrine tumors, van Lier *et al.* reported the synthesis of phthalocyanine-oestradiol conjugates³¹, and their photodynamic activities. Phthalocyanine-oestradiol conjugates were prepared with both aliphatic and aromatic alkynyl spacers in order to modulate the overall amphiphilicity of the molecule. The highest receptor binding affinities were observed with lipophilic conjugates coupled *via* a relatively long spacer while the sulfonated analogues showed little binding affinities. Surprisingly, the most hydrophilic trisulfonated phthalocyanine-oestradiol described the highest photocytotoxicity (EMT6 cells) comparable to those reported for the nonconjugated phthalocyanine. The nature of the spacer did not seem to influence the biological activity. Grafting of estrone, the biosynthetic precursor of oestradiol receptors overexpressed by breast cancer cells, was achieved by Maree *et al.*³². From a photophysical point of view, aggregation was prevented due to the presence of axial ligands in all complexes. From the biological point of view, the octaoestrone phthalocyanine showed the best promise for detection through fluorescence and for treatment since this complex has the longest triplet lifetime.

D. Nucleus and DNA

The cell nucleus is the most sensitive site, in contrast to cell membranes and other cytoplasmic organelles. Therefore, creation of a molecule of $^1\text{O}_2$ in close proximity to the cancer cell DNA would dramatically increase the odds of cell death whether by induction of apoptosis or by necrosis. Efforts have therefore been made to enhance delivery of the photosensitizer to the cell nucleus.

Different nuclear localization signal (NLS) sequences, contained in targeting proteins, have been tested to favour intranuclear delivery of photosensitizers into the target cells³³. Gariépy's group has designed branched peptides that act as multitasking intracellular vehicles³⁴. These vehicles incorporate eight identical peptide arms coding for two functional domains, namely a pentyllysine domain acting as a cytoplasmic transport sequence and the simian virus SV40 large T antigen NLS which guide their nuclear uptake. These squid-like intracellular vehicles are referred to as loligomers. By solid-phase synthesis, the coupling of chlorin e6 (Ce6) to a nucleus-directed linear peptide (Ce6-peptide) or a branched peptide (Ce6-loligomer) composed of eight identical arms, displaying the sequence of the Ce6-peptide was achieved. The authors have shown that cellular distributions of the two conjugates into radiation-induced fibrosarcoma cells (RIF-1) clearly differed. Nevertheless, an enhanced (1.5-fold) nuclear localization was only significant for Ce6-loligomer, compared to Ce6-peptide. With the goal to enhance the photodynamic activity of Ce6 by the directed delivery of photosensitizers, Sobolev *et al.* have also shown that photosensitizers can be successfully redirected within cells by using cross-linked modular polypeptide transporters possessing: (i) an internalizable ligand providing a cell-specific delivery; (ii) a module enabling escape from endosomes; (iii) a NLS conferring interaction with importins, the cellular proteins mediating active translocation into the nucleus; (iv) and, a module allowing attachment of the photosensitizer.

Rosenkranz and coworkers³⁵ describe the design, production and characterization of bacterially expressed modular recombinant transporters (MRT) for bacteriochlorin p_6 comprising: (i) the α -melanocyte-stimulating hormone (MSH) as the internalizable ligand, (ii) the optimized T-ag NLS, (iii) the Escherichia coli hemoglobin-like protein HMP as a carrier, and (iv) an endosomolytic amphipathic peptide. The MRT delivered the PS into the nuclei of murine melanoma cells and provided for several orders of magnitude greater cytotoxicity than free PS.

A large number of nucleobase porphyrins, which are of interest for nucleus targeting, have also been described in the literature. Koval *et al.* have first reported in 2001 the synthesis of oligonucleotide-phthalocyanines conjugates for specific DNA modifications *in vitro* and *in vivo* for the development of sequence specific gene targeting reagents³⁶. Due to the presence of a phthalocyanine core and adenine substituent, these compounds present strong intermolecular interactions, resulting in a poor solubility in common organic solvents and unusual spectral features (observation of fluorescence emission despite strong aggregation). No biological evaluation was performed.

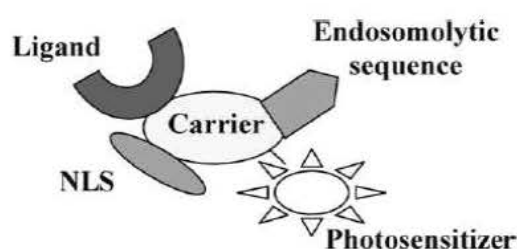


Figure 1. Scheme of distinct modules conferring cell-specific targeting for photosensitizers. The various sequence modules for cell surface binding and uptake (a ligand), an endosomolytic sequence, and a NLS as well as the photosensitizer, are linked to the carrier molecule³³

E. Folic Acid Receptor

The vitamin folic acid is a ligand able to target bioactive agents quite specifically to folate receptor (FR)-positive cancer cells. The FR, which is a well-known cancer cell-associated protein, can actively internalize bound folates *via* endocytosis. Folate receptors exist in three major forms namely FR- α , FR- β and FR- γ . The FR- α form is overexpressed by many types of tumor cells, including ovarian, endometrial, colorectal, breast, lung, renal, neuroendocrine carcinomas and brain metastases. Upon receptor interaction, the folic acid-receptor complex is taken up by cells and moves into many organelles involved in endocytotic trafficking, providing for cytosolic deposition. Proper synthesis procedures have been pointed out to link folic acid to molecules in order to develop targeting delivery systems. It was demonstrated that the glutamate γ -carboxyl group modification does not induce significant loss of folic acid affinity for the receptor. Moreover, due to its high stability, compatibility with both organic and aqueous solvent, low-cost, non-immunogenic character, ability to conjugate with a wide variety of molecules, and low molecular weight, folic acid has attracted

wide attention as a targeting agent for tumor detection. Numerous examples that take advantage of folic acid uptake to promote targeting and internalization include inorganic nanoparticles, polymer nanoparticles, polymeric micelles, lipoprotein nanoparticles, tumor imaging agents, and dendrimers. For example, folic acid was recently covalently anchored on the surface of gold nanorods with silane coupling agent. The resultant folic acid-conjugated silica-modified gold nanorods show highly selective targeting, enhanced radiation therapy and photo-thermal therapy effects on MGC803 gastric cancer cells, and also exhibited strong X-ray attenuation for *in vivo* X-ray and computed tomography (CT) imaging³⁷.

Novel amphiphilic polysaccharide/photosensitizer conjugates synthesized by chemical conjugation of heparin with pheophorbide a and FA were investigated. The anticoagulant activity of heparin-PhA (HP) and folate-heparin-PhA (FHP) conjugates was significantly decreased compared to that of heparin, thereby potentially reducing the hemorrhagic side effects. HP and FHP nanoparticles exhibited marked phototoxicity on HeLa cells and were minimally dark-toxic without light treatment³⁸.

Our group synthesized two new conjugates composed of folic acid coupled to 4-carboxyphenylporphyrin *via* two short linkers that were different in nature but similar in size. Both conjugated photosensitizers showed improved intracellular uptake in KB cells acting as a positive control due to their overexpression of FR- α . Using a short PEG, 2,2'-(ethylenedioxy)-bis-ethylamine, as spacer arm, our group demonstrated that the uptake of this conjugate was on average 7-fold higher than tetraphenylporphyrin used as a reference and that the cells were significantly more sensitive to folic acid-conjugated porphyrin-mediated PDT. We also demonstrated that *in vivo* selectivity of meta tetra(hydroxyphenyl)chlorin (*m*-THPC)-like photosensitizer conjugated to folic acid exhibited enhanced accumulation in KB tumors *in vivo* compared to *m*-THPC, 4 hours after intra-venous injection³⁹. Tumor-to-normal tissue ratio exhibited a very interesting selectivity for the conjugate (5:1) in KB tumors. An aspect that is important for folic-acid-mediated drug delivery concerns the rate of FR recycling between the cell surface and its intracellular compartments. Accumulation of folate conjugates in KB cells will depend upon not only the number and accessibility of FR on the cell surfaces but also the time required for unoccupied receptors to recycle back to the cell surface for additional conjugated QDs uptake. Using radioactive conjugates, Paulos *et al.* found empty FR+ to unload their cargo and return to the cell surface in about 8 to 12 hours⁴⁰. Using folic acid-linked drugs in a FR-targeting strategy could be considered as an efficient method to improve selectivity of anti-cancer treatment, specifically to FR+ positive cancer cells.

Stefflova *et al.* prepared a construct (pyro-peptide-folate, PPF) consisting of three compounds: (1) pyropheophorbide, (2) peptide as linker, (3) folate as targeting moiety⁴¹. They observed a higher accumulation of PPF in KB cells compared to HT1080 used as negative control, leading to a more effective photodynamic effect. The effect of folate was also confirmed *in vivo* with an accumulation of PPF in KB tumors (KB *versus* HT1080 tumors 2.5:1). It was interesting to note that the short peptide used as spacer considerably improved the delivery efficiency with a reduction (50-fold) in PPF uptake in liver and spleen.

F. Cholecystokinin A Receptor (CCK_A)

A peptide hormone cholecystokinin CCK8 (H-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) is known to interact with CCK_A, a receptor that is overexpressed in some colonic, gastric and brain cancers⁴². De Luca *et al.* described the synthesis of 5,10,15-tris(2,6-dichlorophenyl)-20-(4 carboxyphenyl)porphyrin (abbreviated PK) covalently bound to CCK8, using a lysine residue as a spacer. A molecular dynamics analysis indicated that the conformational characteristics of the CCK8/CCK_A receptor-model complex and of the PK-CCK8/ CCK_A receptor-model complex were similar⁴³. This evidence supported the hypothesis that the introduction of the porphyrin-Lys moiety did not influence the mode of ligand binding to the CCK_A receptor model. A NMR conformation study of the PK-CCK8 conjugate was also carried out in dimethylsulfoxide. No Nuclear Overhauser Effect correlation between the porphyrin ring protons and the peptide chain of the molecule were observed, indicating that the porphyrin macrocycle does not lie close to the peptide moiety of PK-CCK8. The authors concluded that the presence of the porphyrin substituent at the *N*-terminus of CCK8 did not interfere with the conformation of the peptide residues supposed to be involved in receptor binding. This study suggested that peptide-photodynamic drug conjugates approach might be useful for targeting the tumor cells expressing CCK_A receptor. Cawston and Miller⁴⁴ reviewed the therapeutic potential of highly selective partial agonists and allosteric modulators of the type 1 cholecystokinin receptor. These peptides could be conjugated to PS to target cancer cells displaying overexpression of CCK receptor.

G. Gonadotropin-releasing Hormone (GnRH) Receptors

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) is considered as a key integrator between the nervous and the endocrine systems and plays a pivotal role in the regulation of the reproductive system. Several studies revealed that GnRH and its receptors also play extra pituitary roles in numerous normal and malignant cells or tissues (for review, see⁴⁵). Thus, GnRH analogues, both agonists and antagonists, have attracted great interest because of their potential application in the treatment of diseases such as prostate and breast cancers. Their mechanism of action is believed to be related to gonadal steroid deprivation. This phenomenon results from GnRH analogue action that leads to down-regulation of the GnRH receptors (GnRH-R) and to desensitization of the pituitary gonadotropes. GnRH-R expression was identified on different tumors (breast, ovarian, endometrial, prostate, renal, brain, pancreatic, melanomas, non-Hodgkin's lymphomas, etc), and the limited number of GnRH-R in normal tissues provided a basis for the development of diagnostic and therapeutic approaches of cancer. Rahimipour *et al.* described the coupling of protoporphyrin IX to peptides acting as GnRH agonists with the aim to selectively target GnRH-R that are overexpressed in many prostate and breast cancers⁴⁶. Conjugates obtained exhibited binding affinity for GnRH receptors, as assessed *in vitro* by displacement assays using ¹²⁵I[D-Lys6]GnRH as the radioligand. The affinity of the photosensitizer-peptide conjugates was found to be lower than that of the corresponding peptide. Photodynamic activity was however enhanced (about 1.5-fold) in GnRH expressing-pituitary gonadotrope aT3-1 cells, compared to unconjugated protoporphyrin IX. The photodynamic activity of the conjugates was attenuated by co-incubation with the parent peptide, indicating that phototoxicity was receptor-mediated⁴⁶.

H. Transferrin Receptors

As iron is an essential element for cell proliferation and metabolism, and because the increased proliferative activity of malignant cells requires a higher iron supply, it is not surprising that TfR is overexpressed on a variety of malignant cells compared to normal cells. Indeed, the magnitude of TfR expression and turnover is proportional to the proliferative activity of the tumor tissue, because a higher proliferation rate requires more iron. Therefore,

the Tf-TfR system has been used in several formats to target photosensitizer molecules to different types of malignant cells.

Gijssens *et al.* prepared a Tf conjugated polyethylene glycol (PEG)-liposome that contains the photosensitizer aluminum phthalocyanine tetrasulfonate compound. The anti-proliferative activity of the targeted liposomes was evaluated and compared to the native photosensitizer and the non-targeted liposome on HeLa tumor cells. After irradiation, the conjugate was 10 times more photocytotoxic than free photosensitizer whereas the conjugated liposome displayed no photocytotoxicity at all⁴⁷. The high photocytotoxicity of targeted liposome was shown to be the result of a high intracellular concentration in HeLa cells, which could be lowered dramatically by incubating the conjugate with a competing transferrin concentration. Later, this group confirmed the selective uptake of the targeted liposome in human AY-27 transitional-cell carcinoma cells and in an orthotopic rat bladder tumor model⁴⁸. Biodistribution studies revealed that among rats bearing AY-27 cell-derived bladder tumors, intravesical instillation with the targeted liposome resulted in a significant selective accumulation in tumor tissue compared to surrounding healthy tissues (normal urothelium and submucosa/muscle)⁴⁸. More recently, Laptev *et al.* demonstrated that bioconjugates composed of Tf and haematoporphyrin photosensitizer, significantly improve the specificity and efficiency of PDT for erythroleukemic cells⁴⁹.

It has been showed that transferrin is responsible for the cellular accumulation of metal-based drugs such as platinum and ruthenium complexes via transferrin receptor-mediated endocytosis due to the fact that these metal-based drugs also bind to this blood transporter Schmitt *et al.* have coordinated arene ruthenium moieties to pyridylporphyrins⁵⁰. They showed that ruthenium(II) organometallic complexes enhance uptake of the porphyrin by human melanoma cells and that these complexes remain intact following their uptake by cells. Moreover, the organometallic fragments on the pyridylporphyrin ring do not modify the photophysical properties of the photosensitizer. Using fluorescence microscopy, they studied cellular compartmentation of their complexes and noted that they accumulate in cytoplasm of the melanoma cells. Moreover, Lottner and co-workers⁵¹ developed an hematoporphyrin-platinum(II) conjugate and demonstrated that hematoporphyrin-platinum(II) conjugate display the same antiproliferative activity than cisplatin in J82 tumor cells.

I. Lectins Saccharide Receptors

A variety of carbohydrate-conjugated photosensitizers have been synthesized. Since oligosaccharides play important roles in cellular communication through saccharide-receptor interactions which are usually specific and multivalent, their conjugation with a photosensitizer can confer high selectivity and specificity⁵². Among the carbohydrate-binding proteins, galectins share a highly conserved domain with a high affinity for β -galactoside. Pandey *et al.* in 2007 have synthesized a series of carbohydrate-photosensitizer conjugates with different carbohydrate moieties, position of conjugation, types of linkers. The comparative *in vitro/in vivo* studies using the RIF tumor cells and CH3 mice bearing RIF tumors of the series of positional isomers showed a substantial difference in their photosensitizing efficacy. The galectin-1 and -3 binding values for the carbohydrate conjugates obtained by ELISA test showed higher affinity than the corresponding nonconjugate porphyrinimides⁵³. D'Aurias *et al.* in 2009 have reported that human galectin-1 can be characterized as a porphyrin-binding protein based on its tight interactions with Zn/Mn and Au-porphyrins, indicating that galectin-1 may have potential as a delivery molecule to target tumor cells⁵⁴.

It was also reported that asialoglycoprotein (ASGP) receptors were abundantly expressed in the surface of hepatoma cells and mammalian hepatocytes. Several studies suggested that targeting could be accomplished through introduction of galactose residues, which can bind specifically to the ASGP receptors on the cells. Wu *et al.* in 2010 described the synthesis of porphyrin and galactosyl conjugated micelles based on amphiphilic copolymer incorporating galactosyl and porphyrin, and they evaluated their targeting and PDT efficiency in HEp2 and HepG2 cells. Porphyrin and galactosyl conjugated polymer micelles displayed higher targeting and photodynamic efficacy in HepG2 cells than in receptor-negative Hep2 cells⁵⁵. Brevet *et al.* in 2009 synthesized mesoporous silica nanoparticles combining covalent anchoring of the porphyrin to the mesoporous silica matrix and targeting of cancer cells with mannose. These nano-objets presented higher *in vitro* photo-efficiency in MDA-MB-231 through mannose-dependent endocytosis than non-functionalized nanoparticles⁵⁶.

Ferreira *et al.* in 2009 reported the design of synthetic DNA oligonucleotide aptamers selected to bind specifically to O-glycan-peptide signatures of mucin glycoproteins which are specifically expressed on the surface of a broad range of epithelial cancer cells. They showed

that when conjugated to Ce6 and delivered to epithelial cancer cells, these DNA aptamers displayed a significant enhancement (>500-fold increase) in toxicity upon light activation, compared to the free drug and have not cytotoxic effect on cell types lacking such O-glycan-peptide signatures⁵⁷. Ballut *et al.* reported that glycodendrimeric porphyrins interacted more significantly with specific lectin, concavaline A, than the drug compound devoid of any sugar⁵⁸.

Poiroux *et al.* recently covalently linked a porphyrin to a plant lectin (Morniga G), known to recognize tumor-associated T and Tn antigens. The conjugation allowed a quick uptake of photosensitizer by Tn-positive Jurkat leukemia cells and efficient photosensitizer-induced phototoxicity. The conjugate strongly increased (x1000) the photosensitizer phototoxicity towards leukemic Jurkat T cells and specifically purged tumor cells from a 1:1 mixture of Jurkat leukemia (Tn-positive) and healthy (Tn-negative) lymphocytes⁵⁹. The same authors coupled others photosensitizers (TPPS, Al(III)-phthalocyanin AlPcS(4), and chlorin e6) to the protein. Conjugate including a single AlPcS4 per protein shows a strong phototoxicity (LD(50) = 4 nM) when irradiated in the therapeutic window, it preferentially kills cancerous lymphocytes, and the sugar binding specificity of the lectin part of the molecule remains unaltered.

Hammerer *et al.* elaborated pi-conjugated porphyrin dimers and a triphenylamine centered trimer bearing monoethyleneglycol-peracetylated α -mannose targeting moieties, which were synthesized for application to two-photon absorption photodynamic therapy⁶⁰.

J. Tumor Specific Antigens - Targeting Antibodies

It is now widely accepted that neoplastic transformation generates new and specific antigenic biomarkers not present on normal cells. A large amount of studies has proved the effectiveness of anti-cancer PDT using mAb-conjugated photoactivatable molecules as drug delivery systems into tumor tissues⁶¹. Using mAb as antigen-specific carriers for selective delivery of photosensitizer to the tumor is also known as photoimmunotherapy. Such approach combines phototoxicity of the photosensitizers with the selectivity of mAb directed against tumor-associated antigens.

HER2 is a highly upregulated target receptor on tumor cell surfaces such as breast cancer. To enhance photosensitizer immunoconjugate uptake by tumor cells, Savellano MD *et al.* in 2005 suggested multiepitope HER2 targeting strategy. Anti-HER2 photosensitizer immunoconjugates were produced *via* the conjugation of two mAb, HER50 and HER66, to

pyropheophorbide-a. Uptake and phototoxicity experiments using human cancer cells revealed selective uptake and potential photodynamic effect of the immunoconjugates on the HER2-overexpressing target cells. Moreover, the multiepitope targeted photoimmunotherapy was significantly more effective than single-epitope targeted photoimmunotherapy with a single anti-HER2 photosensitizer immunoconjugate⁶², suggesting that multitargeted photoimmunotherapy should also be useful against cancers that overexpress others antigenic receptors.

Recently, Jankun Protein-based nanotechnology: antibody conjugated with photosensitizer in targeted anticancer photoimmunotherapy, [Int J Oncol, 2011] describes an antibody directed against prostate-specific membrane antigen and conjugated with hematoporphyrin (HP) to treat LnCAP human prostate cancer cells⁶³. His results show clearly that mAb/HP conjugates can deliver HP to tumor cells which would result in considerably less HP in the circulation and, therefore, less delivery of HP to normal tissue, resulting in fewer side effects.

Nevertheless, it has been observed, particularly *in vivo* that the large size of the mAb could limit the ability of the immunoconjugate to penetrate solid, deep-seated and poorly vascularized tumors. To overcome this drawback, accumulating recent data suggested that an alternative can be the use of a single chain (sc) Fv mAb fragments (scFv), which are both more efficient at penetrating tumor tissues because of their smaller size and more effectively cleared from the circulation because of the lack of the Fc domain⁶⁴. Staneloudi and co-workers described the development and characterization of an immunoconjugate comprising two isothiocyanato-porphyrins attached to colorectal tumor-specific scFv. They demonstrated that these conjugates had a selective photocytotoxic effect as showed by *in vitro* assays against colorectal cell lines⁶⁴. As indicated in the section 3.1 of the present chapter, more recently Bhatti *et al.* described complex of multiple photosensitizer molecules (verteporfin or pyropheophorbide-a) with anti-HER2 scFv and demonstrated that the photoimmunoconjugates are more potent than either free photosensitizers, effectively killing tumor cells *in vitro* and *in vivo*⁶⁵. Indeed, many evidences suggest that the photoimmunoconjugates produced by coupling photosensitizers to recombinant mAb fragments scFv can not only target specifically and destroy tumor cells, but it is possible to load much more photosensitizing agents on an scFv than to the larger whole mAb⁶⁵, and thus increase the amount of delivered drug molecules in the tumor tissues.

Conclusion

Selective delivery of therapeutic amounts of photosensitizers in diseased tissues is recognized as an absolute requirement for efficient and safe PDT for the treatment of cancers. This is also the challenge to extend the application of PDT for the treatment of a broad ranges of tumor types, as such modality present many advantages over the conventional therapies. For this goal, development in targeted PDT continues to take advantage of the advances in the characterization of molecular mechanisms of tumor development. A large number of specific molecular targets have been identified and exploited in tumor targeting. Many photosensitizing agents have been elaborated and evaluated through *in vitro* and *in vivo* studies; however, only very few have reached clinical evaluation phases. Each of the handful of photosensitizers has specific characteristics, but none includes all the properties of an ideal photosensitizer. Although third-generation photosensitizers have been widely described for selective targeting, very few have been evaluated for clinical applications as the *in vivo* selectivity was not sufficiently high. Nanoparticles, as multifunctional platforms could represent emerging photosensitizer carriers that show great promise for PDT. In biotechnology, their development can overcome most of the shortcomings of classic photosensitizers.

References

- (1) Byrne, J. D.; Betancourt, T.; Brannon-Peppas, L. *Advanced Drug Delivery Reviews* **2008**, *60*, 1615.
- (2) Renno, R. Z.; Terada, Y.; Haddadin, M. J.; Michaud, N. A.; Gragoudas, E. S.; Miller, J. W. *Archives of Ophthalmology* **2004**, *122*, 1002.
- (3) Perret, G. Y.; Starzec, A.; Hauet, N.; Vergote, J.; Pecheur, M. L.; Vassy, R.; Leger, G.; Verbeke, K. A.; Bormans, G.; Nicolas, P.; Verbruggen, A. M.; Moretti, J. L. *Nuclear Medicine and Biology* **2004**, *31*, 575.
- (4) Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M. L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *Journal of Controlled Release* **2006**, *111*, 153.
- (5) Bechet, D.; Tirand, L.; Faivre, B.; Plenat, F.; Bonnet, C.; Bastogne, T.; Frochot, C.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *Pharmaceutical Research* **2010**, *27*, 468.
- (6) Thomas, N.; Bechet, D.; Becuwe, P.; Tirand, L.; Vanderesse, R.; Frochot, C.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* **2009**, *96*, 101.
- (7) Couleaud, P.; Bechet, D.; Vanderesse, R.; Barberi-Heyob, M.; Faure, A. C.; Roux, S.; Tillement, O.; Porhel, S.; Guillemin, F.; Frochot, C. *Nanomedicine* **2011**, *6*, 995.
- (8) Chen, J.; Bierhaus, A.; Schiekofler, S.; Andrassy, M.; Chen, B. S.; Stern, D. M.; Nawroth, P. P. *Thrombosis and Haemostasis* **2001**, *86*, 334.

- (9) Chaleix, V.; Sol, V.; Guilloton, M.; Granet, R.; Krausz, P. *Tetrahedron Letters* **2004**, *45*, 5295.
- (10) Allen, T. M.; Cullis, P. R. *Science* **2004**, *303*, 1818.
- (11) Frochot, C.; Stasio, B. D.; Vanderesse, R.; Belgy, M. J.; Dodeller, M.; Guillemin, F.; Viriot, M. L.; Barberi-Heyob, M. *Bioorganic Chemistry* **2007**, *35*, 205.
- (12) Boisbrun, M.; Vanderesse, R.; Engrand, P.; Olie, A.; Hupont, S.; Regnouf-de-Vains, J. B.; Frochot, C. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 3494.
- (13) Berdowska, I. *Clinica Chimica Acta* **2004**, *342*, 41.
- (14) van Kempen, L. C. L.; de Visser, K. E.; Coussens, L. M. *European Journal of Cancer* **2006**, *42*, 728.
- (15) Law, B.; Tung, C. H. *Bioconjugate Chemistry* **2009**, *20*, 1683.
- (16) Ferrario, A.; Chantrain, C. F.; von Tiehl, K.; Buckley, S.; Rucker, N.; Shalinsky, D. R.; Shimada, H.; DeClerck, Y. A.; Gomer, C. J. *Cancer Research* **2004**, *64*, 2328.
- (17) Sharwani, A.; Jerjes, W.; Hopper, C.; Lewis, M. P.; El-Maaytah, M.; Khalil, H. S. M.; MacRobert, A. J.; Upile, T.; Salih, V. *Archives of Oral Biology* **2006**, *51*, 1104.
- (18) Vihinen, P.; Kahari, V. M. *International Journal of Cancer* **2002**, *99*, 157.
- (19) Zheng, G.; Chen, J.; Stefflova, K.; Jarvi, M.; Li, H.; Wilson, B. C. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **2007**, *104*, 8989.
- (20) Lutsenko, S. V.; Feldman, N. B.; Finakova, G. V.; Posypanova, G. A.; Severin, S. E.; Skryabin, K. G.; Kirpichnikov, M. P.; Lukyanets, E. A.; Vorozhtsov, G. N. *Tumor Biology* **1999**, *20*, 218.
- (21) Soukos, N. S.; Hamblin, M. R.; Keel, S.; Fabian, R. L.; Deutsch, T. F.; Hasan, T. *Cancer Research* **2001**, *61*, 4490.
- (22) Bhatti, M.; Yahioğlu, G.; Milgrom, L. R.; Garcia-Maya, M.; Chester, K. A.; Deonarain, M. P. *International Journal of Cancer* **2008**, *123*, 245.
- (23) Selbo, P. K.; Weyergang, A.; Eng, M. S.; Bostad, M.; Mælandsmo, G. M.; Høgset, A.; Berg, K. *J Control Release*. **2012**, *in Press*.
- (24) Barge, J.; Decreau, R.; Julliard, M.; Hubaud, J. C.; Sabatier, A. S.; Grob, J. J.; Verrando, P. *Experimental Dermatology* **2004**, *13*, 33.
- (25) Cuomo, V.; Jori, G.; Rihter, B.; Kenney, M. E.; Rodgers, M. A. J. *British Journal of Cancer* **1991**, *64*, 93.
- (26) Maree, S. E.; Nyokong, T. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2001**, *5*, 782.
- (27) Konan, Y. N.; Gurny, R.; Allemann, E. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* **2002**, *66*, 89.
- (28) Zheng, G.; Li, H.; Zhang, M.; Lund-Katz, S.; Chance, B.; Glickson, J. D. *Bioconjugate Chemistry* **2002**, *13*, 392.
- (29) Li, H.; Marotta, D. E.; Kim, S.; Busch, T. M.; Wileyto, E. P.; Zheng, G. *Journal of Biomedical Optics* **2005**, *10*.
- (30) Song, L. P.; Li, H.; Sunar, U.; Chen, J.; Corbin, I.; Yodh, A. G.; Zheng, G. *International Journal of Nanomedicine* **2007**, *2*, 767.
- (31) Khan, E. H.; Ali, H.; Tian, H. J.; Rousseau, J.; Tessier, G.; Shafiullah; van Lier, J. E. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* **2003**, *13*, 1287.
- (32) Maree, S.; Phillips, D.; Nyokong, T. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines* **2002**, *6*, 17.
- (33) Schneider, R.; Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Gravier, J.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry* **2006**, *6*, 469.
- (34) Singh, D.; Bisland, S. K.; Kawamura, K.; Garipey, J. *Bioconjugate Chemistry* **1999**, *10*, 745.

- (35) Rosenkranz, A. A.; Lunin, V. G.; Gulak, P. V.; Sergienko, O. V.; Shumiantseva, M. A.; Voronina, O. L.; Gilyazova, D. G.; John, A. P.; Kofner, A. A.; Mironov, A. F.; Jans, D. A.; Sobolev, A. S. *Faseb Journal* **2003**, *17*, 1121.
- (36) Koval, V. V.; Chernonosov, A. A.; Abramova, T. V.; Ivanova, T. W.; Fedorova, O. S.; Derkacheva, V. M.; Lukyanets, E. A. *Nucleosides Nucleotides & Nucleic Acids* **2001**, *20*, 1259.
- (37) Ding, H.; Sumer, B. D.; Kessinger, C. W.; Dong, Y.; Huang, G.; Boothman, D. A.; Gao, J. J. *Controlled Release* **2011**, *151*, 271.
- (38) Li, L.; Bae, B. C.; Tran, T. H.; Yoon, K. H.; Na, K.; Huh, K. M. *Carbohydrate Polymers* **2011**, *86*, 708.
- (39) Gravier, J.; Schneider, R.; Frochot, C.; Bastogne, T.; Schmitt, F.; Didelon, J.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *Journal of Medicinal Chemistry* **2008**, *51*, 3867.
- (40) Paulos, C. M.; Reddy, J. A.; Leamon, C. P.; Turk, M. J.; Low, P. S. *Molecular Pharmacology* **2004**, *66*, 1406.
- (41) Stefflova, K.; Li, H.; Chen, J.; Zheng, G. *Bioconjugate Chemistry* **2007**, *18*, 379.
- (42) Reubi, J. C. *Endocrine Reviews* **2003**, *24*, 389.
- (43) De Luca, S.; Tesauro, D.; Di Lello, P.; Fattorusso, R.; Saviano, M.; Pedone, C.; Morelli, G. *J. Pept. Sci.* **2001**, *7*, 386.
- (44) Cawston, E. E.; Miller, L. J. *British Journal of Pharmacology* **2010**, *159*, 1009.
- (45) Aguilar-Rojas, A.; Huerta-Reyes, M. *Oncology Reports* **2009**, *22*, 981.
- (46) Rahimpour, S.; Ben-Aroya, N.; Ziv, K.; Chen, A.; Fridkin, M.; Koch, Y. *Journal of Medicinal Chemistry* **2003**, *46*, 3965.
- (47) Gijssens, A.; Derycke, A.; Missiaen, L.; De Vos, D.; Huwyler, J.; Eberle, A.; de Witte, P. *International Journal of Cancer* **2002**, *101*, 78.
- (48) Derycke, A. S. L.; Kamuhabwa, A.; Gijssens, A.; Roskams, T.; De Vos, D.; Kasran, A.; Huwyler, J.; Missiaen, L.; de Witte, P. A. M. *Journal of the National Cancer Institute* **2004**, *96*, 1620.
- (49) Laptev, R.; Nisnevitch, M.; Siboni, G.; Malik, Z.; Firer, M. A. *British Journal of Cancer* **2006**, *95*, 189.
- (50) Schmitt, F.; Govindaswamy, P.; Zava, O.; Suss-Fink, G.; Juillerat-Jeanerret, L.; Therrien, B. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2009**, *14*, 101.
- (51) Lottner, C.; Knuechel, R.; Bernhardt, G.; Brunner, H. *Cancer Letters* **2004**, *203*, 171.
- (52) Di Stasio, B.; Frochot, C.; Dumas, D.; Even, P.; Zwier, J.; MÅ¼aller, A.; Didelon, J.; Guillemin, F.; Viriot, M. L.; Barberi-Heyob, M. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2005**, *40*, 1111.
- (53) Pandey, S. K.; Zheng, X.; Morgan, J.; Missert, J. R.; Liu, T. H.; Shibata, M.; Bellnier, D. A.; Oseroff, A. R.; Henderson, B. W.; Dougherty, T. J.; Pandey, R. K. *Molecular Pharmaceutics* **2007**, *4*, 448.
- (54) D'Auria, S.; Petrova, L.; John, C.; Russev, G.; Varriale, A.; Bogoeva, V. *Molecular Biosystems* **2009**, *5*, 1331.
- (55) Wu, D. Q.; Li, Z. Y.; Li, C.; Fan, J. J.; Lu, B.; Chang, C.; Cheng, S. X.; Zhang, X. Z.; Zhuo, R. X. *Pharmaceutical Research* **2010**, *27*, 187.
- (56) Brevet, D.; Gary-Bobo, M.; Raehm, L.; Richeter, S.; Hocine, O.; Amro, K.; Loock, B.; Couleaud, P.; Frochot, C.; Morere, A.; Maillard, P.; Garcia, M.; Durand, J. O. *Chemical Communications* **2009**, 1475.
- (57) Ferreira, C. S. M.; Cheung, M. C.; Missailidis, S.; Bisland, S.; Gariepy, J. *Nucleic Acids Research* **2009**, *37*, 866.
- (58) Ballut, S.; Makky, A.; Loock, B.; Michel, J. P.; Maillard, P.; Rosilio, V. *Chemical Communications* **2009**, 224.

- (59) Poiroux, G.; Pitie, M.; Culerrier, R.; Lafont, E.; Segui, B.; Van Damme, E. J. M.; Peumans, W. J.; Bernadou, J.; Levade, T.; Rouge, P.; Barre, A.; Benoist, H. *Plos One* **2011**, *6*.
- (60) Hammerer, F.; Achelle, S.; Baldeck, P.; Maillard, P.; Teulade-Fichou, M. P. *J. Phys. Chem. A* **2011**, *115*, 6503.
- (61) Solban, N.; Rizvi, I.; Hasan, T. *Lasers Surg. Med.* **2006**, *38*, 522.
- (62) Savellano, M. D.; Pogue, B. W.; Hoopes, P. J.; Vitetta, E. S.; Paulsen, K. D. *Cancer Res.* **2005**, *65*, 6371.
- (63) Jankun, J. *Int. J. Oncol.* **2011**, *39*, 949.
- (64) Staneloudi, C.; Smith, K. A.; Hudson, R.; Malatesti, N.; Savoie, H.; Boyle, R. W.; Greenman, J. *Immunology* **2007**, *120*, 512.
- (65) Bhatti, M.; Yahsioglu, G.; Milgrom, L. R.; Garcia-Maya, M.; Chester, K. A.; Deonarain, M. P. *Int. J. Cancer* **2008**, *122*, 1155.

PARTIE II

Ciblage de la vascularisation tumorale en PDT

La première partie de ma thèse a été consacrée à l'amélioration du ciblage vasculaire en PDT pour promouvoir la destruction des vaisseaux associés à la tumeur, et ainsi conduire à l'asphyxie tumorale. Notre stratégie a nécessité l'utilisation d'une molécule de nature peptidique comme système d'adressage couplé à la chlorine.

I. Vascularisation tumorale

La croissance tumorale est dépendante de la néovascularisation associée, ainsi le passage de la phase latente à la phase agressive est sous contrôle direct de la néovascularisation tumorale [127]. La formation du stroma tumoral s'accompagne de la formation de nouveaux vaisseaux détournés au profit de la tumeur, afin de l'alimenter en nutriments, O₂ et autres oligoéléments nécessaires à sa croissance. La néovascularisation tumorale, *via* son phénotype angiogénique et l'architecture vasculaire qui en découle, se présente comme une cible thérapeutique majeure pour l'éradication tumorale en PDT.

1. Morphologie et angiogenèse de la vascularisation tumorale

L'architecture des vaisseaux sanguins tumoraux est différente de celle des capillaires normaux (**Figure 11**). Elle est souvent anarchique et l'arborisation est irrégulière. Leurs parois sont bordées de cellules endothéliales parfois fenêtrées, reposant sur une membrane basale souvent incomplète ou dissociée. Les péricytes, qui jouent un rôle important dans la régulation du flux circulatoire, sont rares ou absents. Il en résulte une augmentation de la perméabilité vasculaire et l'extravasation d'hématies. Enfin, les réseaux capillaires sont dépourvus de sphincters pré-capillaires. Le flux sanguin est donc discontinu ; il peut s'arrêter, voire s'inverser. Malgré la formation de néovaisseaux, il est possible d'observer une hypoxie et une nécrose intratumorale.

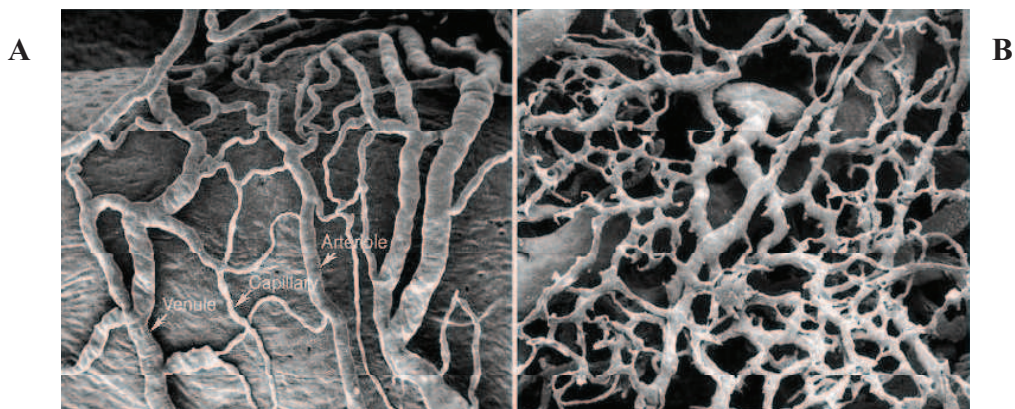


Figure 11 : Comparaison de la morphologie entre les vaisseaux sanguins normaux et tumoraux par microscopie électronique à balayage, d'après [128]. **A**, *vasa vasorum* de sinus carotidien de rat. Le réseau vasculaire normal présente un agencement clair en artérioles, capillaires et veinules. **B**, xénogreffe de tumeur humaine chez la souris *nude*. Le réseau vasculaire tumoral est désorganisé. Artérioles, capillaires et veinules ne sont pas clairement identifiables.

2. Angiogenèse tumorale

L'angiogenèse tumorale est définie comme la formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux préexistants sous l'influence directe ou indirecte d'un foyer tumoral [129]. Ce sont les cellules tumorales elles-mêmes qui produisent et sécrètent des facteurs diffusibles capables de stimuler la croissance, la migration et la différenciation des cellules endothéliales.

A l'état physiologique, l'angiogenèse joue un rôle essentiel au cours de l'embryogenèse, mais également à l'âge adulte lors par exemple des phénomènes de cicatrisation, de réparation tissulaire, de l'adaptation musculaire à l'effort. A l'état pathologique, l'angiogenèse est impliquée dans de nombreuses maladies telles que la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) [130] et le cancer.

En cancérologie, l'angiogenèse tumorale est initiée par l'état hypoxique de la tumeur. En effet, la tumeur d'une taille inférieure à 1-2 mm³ est indépendante (tumeur *in situ*) et les apports en O₂ et nutriments sont assurés par simple diffusion. Lorsque la tumeur augmente en volume, l'O₂ et les nutriments n'atteignent plus les cellules centrales. La tumeur entre alors dans un état hypoxique. Ce stress déclenche la production et la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques (notamment le VEGF) par les cellules tumorales, entraînant la rupture de l'équilibre entre facteurs anti-angiogéniques et facteurs pro-angiogéniques : c'est le *switch* angiogénique [129, 131, 132]. La tumeur passe de la phase dormante ou avasculaire à la phase vasculaire. Les néovaisseaux tumoraux assurent l'apport en O₂ et nutriments nécessaires à la croissance tumorale et permettent l'évacuation des déchets issus de cette croissance ainsi que la libération de métastases (**Figure 12**).

Etape 1:

Initiation

Sécrétion de facteurs pro-angiogéniques (VEGF, FGFb) par les cellules tumorales, induite par l'hypoxie

Etape 2:

Dégradation de la membrane basale

Etape 3:

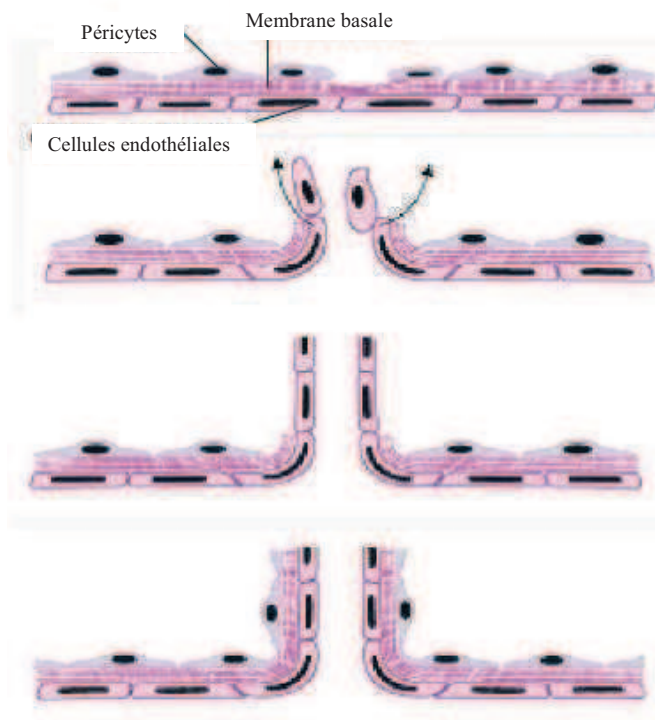
Migration des cellules endothéliales

Etape 4:

Prolifération des cellules endothéliales

Etape 5:

Remodelage vasculaire



Rôle des MMP, uPA, tPA

Rôle des MMP, uPA, tPA, VEGF, VEGFR

Rôle du VEGF et VEGFR

Rôle du PDGF, TGFβ, Ang-1 et Tie 2

Figure 12 : L'angiogenèse tumorale. **Etape1** : activation des cellules endothéliales vasculaires par le VEGF sécrété par les cellules tumorales. **Etape 2** : détachement des péricytes et dégradation de la lame basale. **Etape 3** : migration des cellules endothéliales vasculaires vers la tumeur par chimiotactisme. **Etape 4** : prolifération des cellules endothéliales vasculaires. **Etape 5** : formation de néovaisseaux, recrutement des composants de la paroi vasculaire par les cellules endothéliales.

Sans cette vascularisation, la tumeur stoppe sa croissance, voire s'asphyxie. C'est pourquoi les nouvelles stratégies anti-tumorales visent à inhiber les processus d'angiogenèse tumorale [133-135].

a. Initiation de l'angiogenèse : la *switch* angiogénique

L'expression du facteur de croissance VEGF (*vascular endothelial growth factor*) est absolument requise pour le *switch* angiogénique [131]. L'hypoxie est un des principaux facteurs déclenchant la synthèse du VEGF-A par les cellules tumorales [131, 134] (**Figure 13**). Ce processus implique le facteur de transcription HIF (*hypoxia inductible factor*) qui agit au niveau du promoteur du gène codant le VEGF-A.

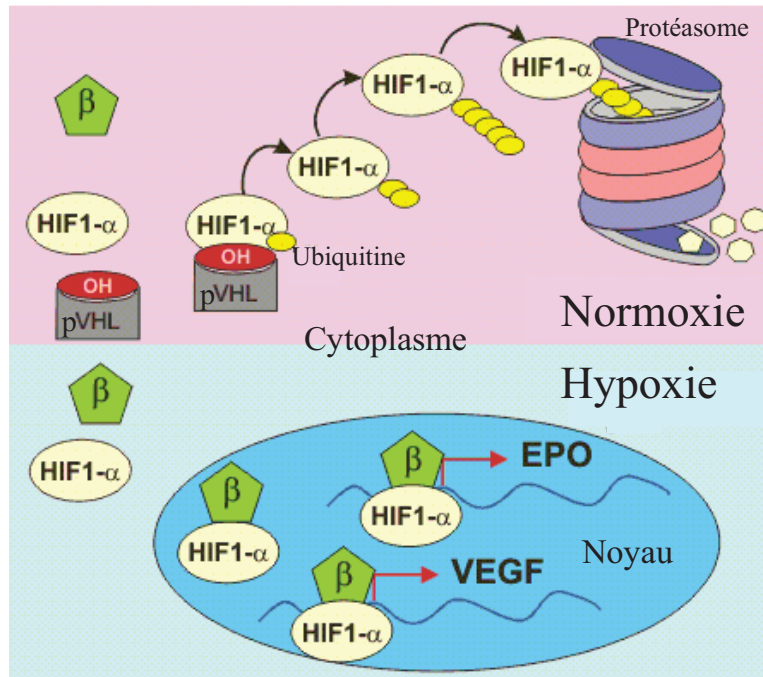


Figure 13 : Activation de l'expression du VEGF-A par l'état hypoxique de la cellule, d'après [136]. Une enzyme appelée prolyl-4-hydroxylase lie l'O₂ et le fixe sur des résidus spécifiques de proline du facteur de transcription HIF-1 α . Une autre protéine, appelée protéine de von Hippel-Lindau, lie ensuite le HIF-1 α oxydé. Le complexe ainsi formé est ensuite ubiquitinylé et dégradé dans le protéasome. En hypoxie, HIF-1 α n'est pas oxydé et se dimérise avec HIF-1 β . Ce complexe est transféré dans le noyau où il peut agir comme facteur de transcription sur le promoteur cible.

Le VEGF ainsi sécrété par les cellules tumorales diffuse dans le microenvironnement tumoral. En se liant aux récepteurs impliqués au niveau des cellules endothéliales, le VEGF induit la libération d'oxyde nitrique (NO) ainsi qu'un changement de morphologie des cellules endothéliales, induisant une vasodilatation des vaisseaux sanguins et une perte de fonctionnalité des jonctions serrées [134]. Il s'en suit une fuite des composés plasmatiques dont le fibrinogène et autres facteurs de coagulation, et le dépôt de fibrine dans l'espace extravasculaire qui transforme le stroma endothélial en environnement pro-angiogénique sur lequel les cellules endothéliales activées pourront migrer [137].

b. Bourgeonnement

Le bourgeonnement correspond à l'apparition de petites masses de cellules endothéliales sur la face externe des vaisseaux sanguins préexistants situés à proximité du foyer tumoral. En effet, les cellules endothéliales activées prolifèrent et donnent rapidement naissance à plusieurs générations de cellules filles dont l'accumulation locale forme des bourgeons endothéliaux.

Le plasminogène extravasé dans le milieu périvasculaire est transformé en plasmine sous l'action des activateurs du plasminogène : l'urokinase (uPA) et l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). La plasmine active ensuite des métalloprotéinases (MMP, *matrix metalloproteinases*), endopeptidases zinc-dépendantes sécrétées par les cellules tumorales, stromales et endothéliales. Ces enzymes vont permettre la dégradation des composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine, structures protéiques de protéoglycane) et de la membrane basale. Les péricytes se détachent et les jonctions entre cellules endothéliales sont altérées. Cette dégradation locale de la matrice extracellulaire (MEC) permet aux cellules endothéliales de migrer. Le facteur de croissance FGFb, et certains isoformes du VEGF sont alors libérés.

c. Migration

Les cellules endothéliales acquièrent les propriétés nécessaires à leur migration dans la matrice extracellulaire et migrent en direction de la source du stimulus angiogénique (la tumeur) par chimiotactisme. Les principaux facteurs de croissance intervenant dans le stimulus sont le FGFb et le VEGF [138]. La fixation de ces facteurs à leurs récepteurs exprimés à la surface des cellules endothéliales entraîne la sécrétion de protéines extracellulaires par ces cellules telles que des protéases qui dégradent la MEC, et la fibronectine et la tenascine qui facilitent la migration cellulaire [129]. Enfin, pour interagir avec les protéines de leur nouvel environnement, les cellules endothéliales activées expriment de nouveaux récepteurs de la MEC, notamment les ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), les VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), les sélectines E et P et les intégrines (e.g. $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$), absentes des cellules endothéliales quiescentes.

d. Remodelage vasculaire

Le remodelage vasculaire correspond à l'adaptation continue du réseau vasculaire aux besoins du foyer tumoral. En permanence, au sein des réseaux vasculaires péri-tumoraux, des capillaires disparaissent pendant que d'autres se développent rapidement, drainant à leur profit l'essentiel du flux circulatoire sanguin. De plus, de nouveaux bourgeons capillaires formés lors de phases successives de stimulation angiogénique fusionnent avec les capillaires préexistants.

Au terme de la migration, les capillaires néoformés entrent dans une phase de stabilisation qui aboutit à la réorganisation de la paroi vasculaire. La mise en place de la paroi vasculaire est caractérisée par la formation d'une lame basale riche en laminine et en collagène IV ainsi que par l'accolement de péricytes, résultant de la différenciation locale de cellules mésenchymateuses non spécialisées.

II. Facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)

La famille du VEGF (*vascular endothelial growth factor*) comprend 5 glycoprotéines sécrétoires chez l'Homme : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et PlGF-1 (*placenta growth factor-1*). VEGF-E et VEGF-F proviennent respectivement d'un virus et de venin de serpent [134].

1. VEGF-A

Le VEGF-A a été la première glycoprotéine de la famille VEGF découverte en 1983 par Senger *et al.* [139]. Il lui donna le nom de VPF (*vascular permeability factor*) puisqu'il étudia sa sécrétion par les cellules tumorales et son rôle dans la perméabilité vasculaire.

Le VEGF-A est une glycoprotéine homodimérique de 45 kDa, essentielle pour le *switch* angiogénique. Le gène du VEGF-A est organisé en 8 exons séparés par 7 introns et se situe sur le chromosome 6p21.3 (**Figure 14**).

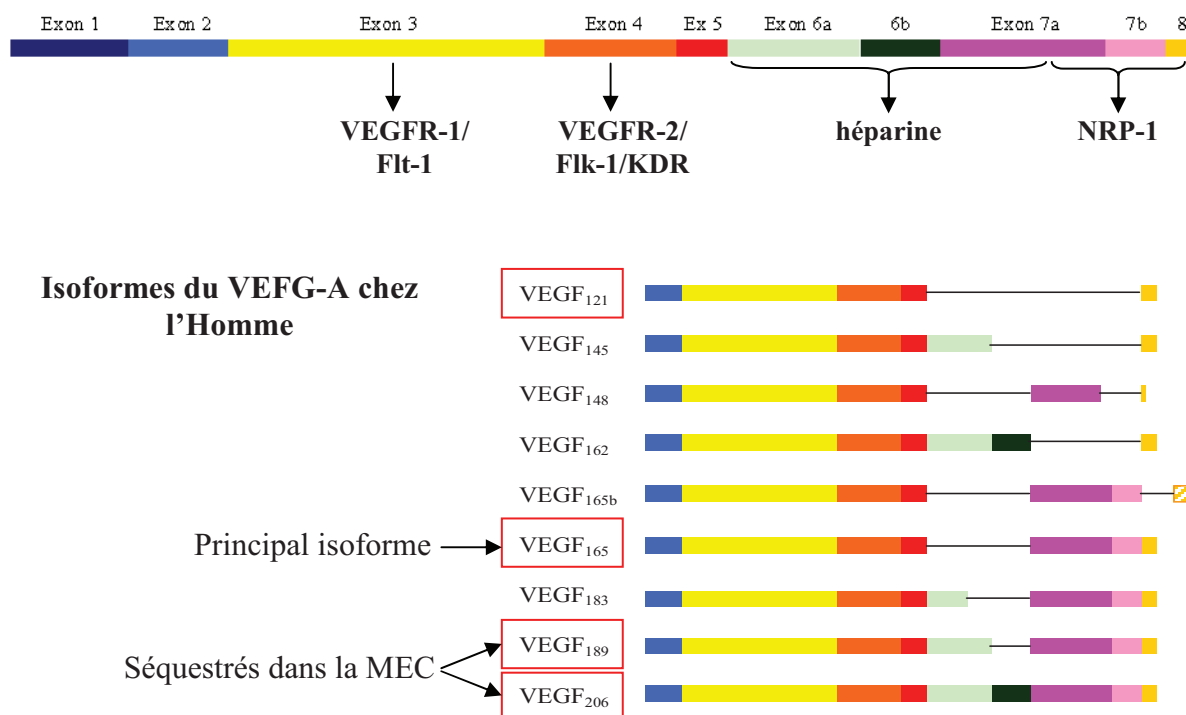


Figure 14 : Gène du VEGF-A et son épissage alternatif. L'épissage alternatif du gène codant le VEGF-A aboutit à différents isoformes dont les principaux sont composés de 121, 165, 189 et 206 acides aminés (VEGF-A₁₂₁, VEGF-A₁₆₅, VEGF-A₁₈₉, VEGF-A₂₀₆, respectivement). Les VEGF-A₁₈₉ et VEGF-A₂₀₆ sont séquestrés dans la MEC, où ils sont stockés par liaison avec les protéoglycanes à héparine et à héparane sulfate. Leur activation nécessite leur libération par des protéases telles que la MMP-9 et la plasmine qui clivent la glycoprotéine en position C-terminale. Le VEGF-A₁₂₁ est sécrété sous forme libre dans le milieu extracellulaire puisqu'il ne possède pas l'exon 6 responsable de la liaison de la glycoprotéine à l'héparine liée aux protéines de la MEC. Le VEGF-A₁₆₅ est l'isoforme prédominant et est surexprimé dans de nombreuses tumeurs solides. Il existe sous la forme libre et la forme séquestrée dans la MEC. Tous les isoformes du VEGF-A sont capables de lier VEGFR-1 et VEGFR-2. Seuls les isoformes 165, 189 et 206 sont capables de lier neuropiline-1.

2. Autres membres de la famille du VEGF

Le facteur de croissance placentaire ou PIGF (*placenta growth factor*) est, comme le VEGF-A, une glycoprotéine homodimérique. Il a été découvert à l'origine dans le placenta humain et partage environ 50% de similarité avec le VEGF-A₁₆₅ [140]. Il reconnaît VEGFR-1, mais pas VEGFR-2 et -3 [141, 142]. L'isoforme PIGF-2 peut se lier à l'héparine et aux récepteurs neuropiline-1 et neuropiline-2 [140]. Le PIGF peut entrer en compétition avec le VEGF-A₁₆₅ pour la liaison à VEGFR-1 [143]. Il joue un rôle dans certains états pathologiques chez l'adulte comme la croissance tumorale ou encore l'angiogenèse [134].

Le VEGF-B ou VRF (*VEGF-related factor*) est un ligand de VEGFR-1 et NRP-1 et peut former un hétérodimère avec le VEGF-A [144].

Le VEGF-C est produit comme une protéine précurseur qui peut être activée par des protéines intracellulaires PC5 et PC7 (*proprotein convertases*) [144]. Il se fixe à VEGFR-2 et -3

La forme mature du VEGF-D se fixe à VEGFR-2 et -3. C'est un facteur mitogène des cellules endothéliales, angiogéniques et lymphangiogéniques [145]. Les VEGF-C et -D jouent un rôle essentiel durant l'embryogenèse et la lymphangiogenèse post-natale. Ils sont également impliqués dans la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins, particulièrement durant les processus pathologiques tels que la croissance tumorale [134].

Le VEGF-E a été identifié dans le génome du virus parapoxvirus Orf [134]. Il s'agit en fait d'un groupe de protéines, liant VEGFR-2, mais ne liant ni VEGFR-1, ni VEGFR-3.

Le VEGF-F a été isolé à partir du venin de serpent. Ses différents isoformes lient VEGFR-1 et -2 avec des affinités différentes, mais ne lient pas VEGFR-3 et NRP-1.

3. Récepteurs au VEGF

a. Récepteurs à activité tyrosine kinase

Le VEGF active l'angiogenèse par l'intermédiaire de plusieurs récepteurs, dont trois récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) : VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 [134]. VEGFR-1 et VEGFR-2 ont été identifiés sur les cellules endothéliales vasculaires et jouent un rôle dans l'angiogenèse, alors que VEGFR-3 a été identifié sur les cellules endothéliales lymphatiques et joue un rôle dans la lymphangiogenèse.

VEGFR-1 et VEGFR-2 présentent 44 % d'homologie entre-eux. Ils possèdent une partie extracellulaire composée de sept domaines homologues aux immunoglobulines (*Ig-like*), un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire à activité TK. VEGFR-3 présente les mêmes domaines intracellulaires et transmembranaires que VEGFR-1 et VEGFR-2 mais son domaine extracellulaire est clivé par protéolyse au niveau du 5^{ème} domaine *Ig-like* et les fragments générés restent assemblés par un pont disulfure [146]. Tous les récepteurs n'ont pas la même affinité pour les différents membres de la famille du VEGF (**Tableau II**).

Tableau II : Affinité des membres de la famille du VEGF pour leurs récepteurs (valeur des constantes de dissociation K_d en mol.L⁻¹), d'après [147].

	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	NRP-1	NRP-2	Héparine
VEGF-A ₁₆₅				1,8.10 ⁻¹⁰	1,3.10 ⁻¹⁰	+
VEGF-A ₁₂₁				-	-	-
VEGF-A ₁₄₅	1,0.10 ⁻¹¹	0,7-7,7.10 ⁻¹⁰	-	-	7,0.10 ⁻¹⁰	+
VEGF-A ₁₈₉				+	+	+
VEGF-A ₂₀₆				+	+	+
PlGF-1	1,9.10 ⁻¹⁰			-	-	-
PlGF-2	2,5.10 ⁻¹⁰	-	-	+	+	+
VEGF-B ₁₆₇	10 ⁻¹¹ -10 ⁻¹⁰			+	N.D.	+
VEGF-B ₁₈₆				+		-
VEGF-C (précurseur)	-	~10 ⁻⁸	~10 ⁻⁹		-	-
VEGF-C (clivé)		4,1.10 ⁻¹⁰	1,4.10 ⁻¹⁰	-	+	-
VEGF-D (précurseur)	-	1,6.10 ⁻⁵	8,2.10 ⁻⁷		-	-
VEGF-D (clivé)		5,6.10 ⁻⁸	2,0.10 ⁻⁸	-	+	-
VEGF-E	-	3,3.10 ⁻¹⁰	-	A divers degrés selon isoforme	N.D.	Selon isoforme
Vammine (VEGF-F1)						
TfsvVEGF (VEGF-F2)	-	4,1.10 ⁻¹⁰	-	-	N.D.	+
Pm-VEGF (VEGF-F2)	~ 10 ⁻¹¹	10 ⁻⁹ - 10 ⁻⁸	-	-	N.D.	+
	1,7.10 ⁻¹¹	6,5.10 ⁻⁹	-	-	N.D.	N.D.

Signification des abréviations : -, pas de liaison au récepteur ; +, une liaison au récepteur ; N.D., non déterminé.

- VEGFR-1

Il lie les VEGF-A, VEGF-B et PlGF avec une forte affinité. Ce récepteur est essentiel pour l'angiogenèse physiologique et embryologique. Les souris *knock down* pour VEGFR-1 meurent *in utero* [148]. Outre l'angiogenèse, VEGFR-1 joue un rôle dans l'hématopoïèse, en induisant le recrutement des progéniteurs des cellules endothéliales, l'augmentation de l'adhésion des cellules NK (*natural killer*) et la migration des monocytes et macrophages. VEGFR-1 peut s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec VEGFR-2, induisant des signaux de transduction différents [134, 149].

- VEGFR-2

Il lie fortement le VEGF-A et avec moins d'affinité les VEGF-C et VEGF-D. VEGFR-2 est le principal récepteur du VEGF-A pour l'induction de l'angiogenèse. Il joue un rôle dans la perméabilité vasculaire, la prolifération, l'invasion, la migration et la survie des cellules endothéliales [134]. VEGFR-2 est également essentiel dans le processus d'embryogénèse puisque les souris *knock down* pour VEGFR-2 meurent *in utero*. Comme décrit pour VEGFR-1, VEGFR-2 peut s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec VEGFR-1.

- VEGFR-3

VEGFR-3 lie uniquement les VEGF-C et VEGF-D. Ce récepteur joue un rôle dans la vasculogenèse embryologique et plus particulièrement dans le développement cardiovasculaire et le remodelage du réseau vasculaire primaire chez l'embryon [134]. Chez l'adulte, VEGFR-3 n'est présent qu'au niveau des vaisseaux lymphatiques et joue un rôle important dans la lymphangiogenèse.

b. Neuropilines

La famille des neuropilines (NRP) compte deux membres, NRP-1 et NRP-2, eux-mêmes divisés en isoformes solubles ou non [150-152]. Les neuropilines sont des récepteurs non à activité TK, de 130 kDa. Leur structure comporte cinq domaines : trois domaines extracellulaires (a1a2, b1b2 et c) de 840 acides aminés, un domaine transmembranaire de 25 acides aminés et un domaine intracellulaire de 40 acides aminés (**Figure 15**).

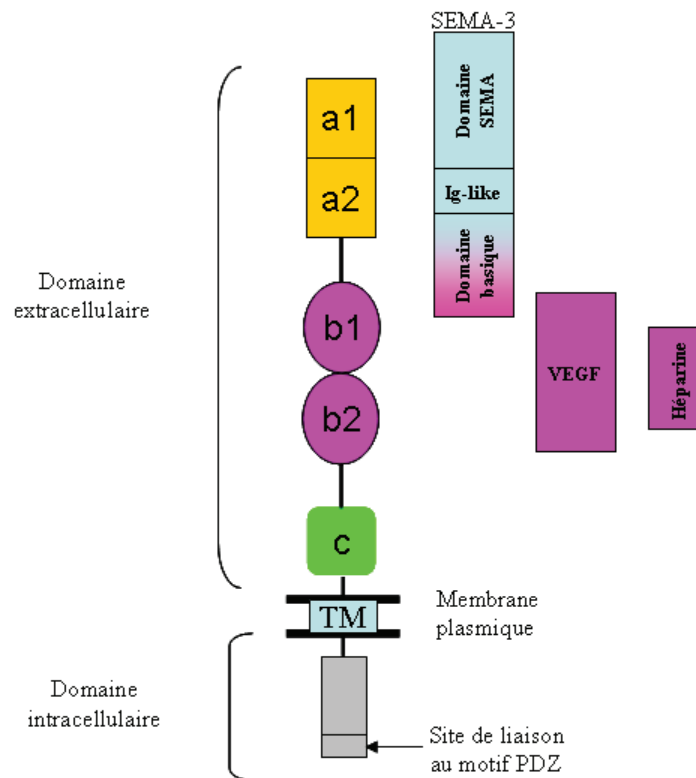


Figure 15 : Structure des neuropilines et leurs ligands, adapté de [153]. Le domaine extracellulaire des protéines transmembranaires neuropilines possède un domaine a1a2, responsable de la liaison aux domaines SEMA, Ig-like et basique des sémaphorines 3, un domaine b1b2 qui lie une partie du domaine basique des SEMA 3, le VEGF-A et l'héparine, et un domaine c impliqué, avec le domaine transmembranaire, dans la dimérisation de neuropiline. Le domaine cytoplasmique possède un domaine de liaison aux protéines à motif PDZ et est impliqué dans la migration des cellules endothéliales [154].

Chacun des trois domaines extracellulaires lie différentes protéines membranaires et extracellulaires pour l'adhésion cellulaire et la régulation cellulaire. Le domaine a1a2 est un CUB domaine (C1r/C1s, uEGF, bmp1) qui présente une homologie de séquence avec les protéines C1r et C1s du complément. Le CUB domaine contient quatre résidus cystéines qui forment deux ponts disulfures. Les domaines a1a2 et b1b2 sont nécessaires à la liaison des ligands : le domaine a1a2 lie les sémaphorines de classe 3 (SEMA-3), le domaine b1b2 est nécessaire à la liaison du VEGF et de l'héparine et participe également à la liaison du domaine basique des SEMA-3 (**Figure 15**). Le domaine b1b2 est homologue aux facteurs de coagulation V et VIII [155]. Le domaine c est un domaine MAM, homologue aux MMP méprines et à la partie N-terminale des récepteurs tyrosine phosphatase μ . Le domaine c et le domaine transmembranaire sont essentiels à l'homodimérisation ou l'hétérodimérisation des NRP. Le domaine cytoplasmique ne possède pas de motif kinase mais un motif de liaison aux protéines à domaine PDZ, suggérant que la transduction du signal passe par l'interaction de protéines à motif PDZ [156]. La protéine NIP est une protéine cytoplasmique de 40 kDa,

possédant un domaine PDZ, et est associée au domaine intracellulaire de NRP-1 [157]. Une étude suggère que cette protéine joue un rôle dans la migration des cellules endothéliales, médiée par NRP-1 [157]. Cependant, même si NRP-1 interagit directement avec des protéines cytoplasmiques, le signal intracellulaire n'est transduit qu'après dimérisation avec d'autres protéines transmembranaires telles que VEGFR dans le cas de la signalisation par le VEGF pour l'angiogenèse, et les plexines dans le cas de la signalisation par les SEMA-3 pour la guidance axonale.

Sur les cellules endothéliales, NRP-1 peut former des complexes avec VEGFR-1 et VEGFR-2 lorsqu'un ligand de la famille du VEGF, capable de se fixer à NRP-1, est présent (**Figure 16**). Il se forme alors un complexe ternaire. La présence de NRP-1 accroît les effets biologiques du VEGF-A médiés par VEGFR-2, en présentant le VEGF-A à son récepteur pour augmenter leur taux de liaison, et en amplifiant le signal de transduction intracellulaire qui mène à la migration des cellules endothéliales [154, 158-161]. Cependant, Murga *et al.* ont montré l'implication de NRP-1 dans l'adhésion cellulaire endothéliale, de manière indépendante de VEGFR-2 et dépendante des intégrines [161].

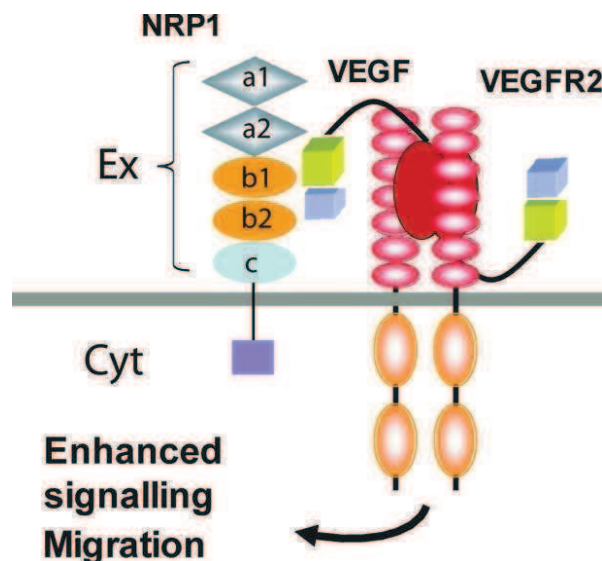


Figure 16 : Modélisation du complexe formé entre NRP-1, VEGF-A₁₆₅ et VEGFR-2, d'après [159]. Le domaine C-terminal du VEGF-A₁₆₅, codé par les exons 7 et 8 du gène, lie NRP-1 par son domaine b1b2. De manière concomitante, le domaine du VEGF-A₁₆₅ codé par l'exon 4 se fixe à VEGFR-2. VEGFR-2 lié au VEGF-A₁₆₅ forme un complexe avec neuropiline-1 et peut également se dimériser avec un 2^{ème} complexe VEGFR-2/VEGF-A₁₆₅. La dimérisation de deux complexes VEGFR-2/VEGF-A₁₆₅ amplifie le signal intracellulaire de migration cellulaire.

Au niveau des cellules neuronales, les protéines transmembranaires de la famille des plexines participent à la signalisation des SEMA-3 en se complexant à NRP-1. Par leur domaine SEMA, les plexines se fixent au domaine a1a2 de NRP-1, puis SEMA-3 lie NRP-1 [162] (**Figure 17**).

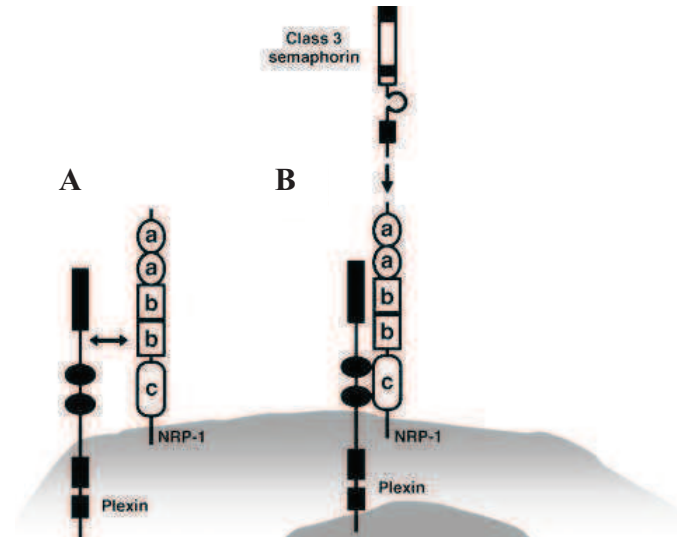


Figure 17 : Mécanisme de complexation entre la plexine, NRP-1 et SEMA-3, d'après [162]. **A**, il y a d'abord dimérisation entre les récepteurs plexine et NRP-1. **B**, puis SEMA 3 lie NRP-1.

Les NRP sont exprimées par de nombreux types cellulaires et particulièrement par les cellules neuronales. Les animaux déficients en NRP-1 et NRP-2 montrent un trajet neuronal anormal et des projections neuronales inappropriées [162]. Au niveau vasculaire, les NRP sont exprimées par les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques et les cellules musculaires lisses. L'expression de NRP-1 par les cellules endothéliales est augmentée par l'activation du VEGF-A sur VEGFR-2 [163]. A l'état embryonnaire, les souris *knock down* pour NRP-1 présentent une désorganisation vasculaire et une absence de réseau capillaire ; elles meurent *in utero*. Les souris déficientes en NRP-2 montrent un développement artériel et veineux normal mais leurs capillaires vasculaires et lymphatiques sont anormaux. Chez l'adulte, les NRP jouent différents rôles dans la néovascularisation : rôle pro-angiogénique après fixation du VEGF et rôle anti-angiogénique après fixation des SEMA-3 [164]. NRP-1 joue un rôle dans la migration et la prolifération des cellules endothéliales [158]. En effet, l'addition d'Ac anti-NRP-1 à des cellules endothéliales de rétine bovine en culture inhibe l'effet mitogène du VEGF-A₁₆₅ [163].

III. Ciblage vasculaire en PDT

Le ciblage vasculaire par PDT appelé *Vascular Targeted Photodynamic therapy* (VTP) consiste à détruire les vaisseaux sanguins tumoraux associés au tissu tumoral. Cette stratégie présente de nombreux avantages par rapport au ciblage direct des cellules tumorales. D'abord, les cellules endothéliales vasculaires sont exposées à doses suffisantes en photosensibilisateur pour engendrer des dommages conséquents. De plus, les molécules d'O₂, nécessaires à la génération des réactions photochimiques, y sont disponibles en quantité suffisante. Enfin, contrairement aux cellules tumorales dont les mutations font varier l'expression des marqueurs moléculaires, les cellules endothéliales vasculaires présentent une expression constante de ces marqueurs, rendant le ciblage plus efficace.

1. Ciblage vasculaire passif

Cette stratégie est basée sur l'accumulation du photosensibilisateur dans le compartiment vasculaire. Trois paramètres interviennent : les propriétés physicochimiques de la molécule photo-activable, l'IDL et le choix de l'irradiance. Les photosensibilisateurs hydrophobes se lient aux lipoprotéines plasmatiques telles que les LDL. Les LDL reconnaissent ensuite leurs récepteurs surexprimés à la surface des cellules endothéliales du fait de leur prolifération accrue.

La diminution de l'IDL peut favoriser également l'effet vasculaire en PDT. En effet, après l'injection du photosensibilisateur par voie i.v., celui-ci circule initialement au niveau du compartiment vasculaire (plasma puis endothélium) et peut ensuite diffuser vers les cellules tumorales. Par conséquent, une irradiation à un IDL court active le photosensibilisateur dans le compartiment vasculaire et induit des dommages vasculaires. Un des photosensibilisateurs les plus performants actuellement dans cette stratégie de ciblage vasculaire passif est le palladium-bactériophéophorbide (Tookad®). La durée de demi-vie plasmatique du Tookad® est d'environ 20 min [165]. Avec ces clairances plasmatiques très rapides, il est nécessaire d'irradier successivement la lésion à traiter après administration pour induire une réponse vasculaire optimale [165-168]. Le Tookad® induit des dommages vasculaires intenses avec des IDL de l'ordre 10 min, sur différents modèles animaux [169,

170], et ces dommages sont réduits par l'application d'IDL plus longs [169]. Le Tookad a passé la phase III d'essai clinique avec succès pour le cancer de la prostate.

Le choix de l'irradiance (reflétant la vitesse à laquelle la lumière est appliquée) semble également être un paramètre important pour générer un effet anti-vasculaire, mais son rôle est moins clair que celui de l'IDL. Chez des animaux traités avec du Photofrin[®] (25 mg/kg), la PDT avec un IDL de 24h et une irradiance de 75 mW/cm² entraîne la modification du diamètre de la lumière des artérioles et des veinules. Ces modifications histologiques ne sont pas observées avec une irradiance de 50 mW/cm² [57].

2. Ciblage vasculaire actif

Cette stratégie est basée sur l'adressage des photosensibilisateurs vers les néovaisseaux tumoraux grâce à la fonctionnalisation par des molécules d'adressage (**Conf. PARTIE I, II. 2.**). Les photosensibilisateurs sont ainsi retenus dans le compartiment vasculaire, voire incorporés aux cellules endothéliales, ce qui permet un effet vasculaire sélectif. Les molécules d'adressage utilisées peuvent être des peptides, des Ac ou d'autres ligands reconnaissant spécifiquement des protéines surexprimées par les cellules endothéliales vasculaires telles que les récepteurs au VEGF, les intégrines et le récepteur à la thrombospondine-1 [1]. L'adressage de photosensibilisateurs pour le ciblage vasculaire en PDT est une stratégie prometteuse pour les traitements de la DMLA et des tumeurs richement vascularisées (*e.g.* prostate).

3. Ligands peptidiques en VTP

Notre équipe a choisi l'utilisation de ligands peptidiques pour l'adressage sélectif des photosensibilisateurs vers les cellules endothéliales vasculaires de phénotype angiogénique. Les peptides sont des molécules de plusieurs acides aminés liés entre eux par des liaisons amides. Leur taille est plus petite que celle des protéines, généralement inférieure à 50 acides aminés. Contrairement aux protéines, les peptides ne possèdent pas de structure tridimensionnelle bien définie. Les peptides présentent de nombreux avantages à être utilisés pour l'adressage d'agents thérapeutiques tels que les photosensibilisateurs [171] (**Tableau III**).

Tableau III : Avantages et inconvénients des peptides pour l'adressage d'agents thérapeutiques, d'après [171].

Avantages	Inconvénients
Molécules de petite taille	Dégradation possible par les endo- et exopeptidases
Bonne perméabilité tissulaire	Ne traverse pas la barrière hémato-encéphalique normale
Non cytotoxiques	Clairance trop rapide
Accès rapide au site tumoral	
Traverse la barrière hémato-encéphalique perturbée	
Faible antigénicité	
Synthèse facile	
Modification chimique facile	
Liaison facile à un espaceur	
Liaison facile à un chélateur	
Marquage radioactif facile	
Liaison haute affinité aux récepteurs	
Clairance rapide	
Agoniste pour leur récepteur (internalisation)	

De plus, ils peuvent être couplés aux photosensibilisateurs hydrophobes pour augmenter leur amphiphilie et ainsi améliorer leur solubilité dans les milieux aqueux [172]. Des peptides cationiques tels que des polylysines ou des polyarginines ont été greffés à des photosensibilisateurs pour augmenter leur incorporation cellulaire, tirant profit des propriétés anioniques des membranes plasmiques cellulaires [173].

Dans le cadre de la VTP, notre équipe a étudié un peptide reconnaissant l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ et un peptide reconnaissant NRP-1. L'intégrine $\alpha_v\beta_3$ est un récepteur transmembranaire hétérodimérique de nature glycoprotéique, surexprimé par de nombreux types cellulaires tumoraux, mais également par les cellules endothéliales en prolifération dans les tissus tumoraux. Le motif RGD (arginine-glycine-aspartate) reconnaît spécifiquement cette intégrine et a été utilisé pour cibler la vascularisation tumorale en PDT [174-176]. La séquence RGD linéaire ou cyclique a été couplée à la chlorine ou à la porphyrine pour réaliser des tests *in vitro* de sélectivité et d'efficacité photodynamique [175]. La présence de la séquence RGD sur

la chlorine ou la porphyrine a significativement amélioré l'incorporation cellulaire des photosensibilisateurs. De plus, cette incorporation cellulaire s'est avérée sélective sur la lignée cellulaire HUVEC (*human umbilical vein endothelial cell*) qui surexprime l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ comparée aux cellules EMT-6 (*murine mammary carcinoma cells*) de phénotype négatif pour $\alpha_v\beta_3$ [175]. Finalement, l'efficacité photodynamique *in vitro* a été significativement améliorée par la présence du motif RGD cyclique couplé à la molécule photo-activable.

Pour le ciblage de NRP-1, notre équipe a décrit la conjugaison du peptide ATWLPPR (alanine-thréonine-tryptophane-leucine-proline-proline-arginine) à la (5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylchlorine (TPC) par l'intermédiaire d'un bras espaceur d'acide aminohexanoïque (Ahx) [177] (**Figure 18**).

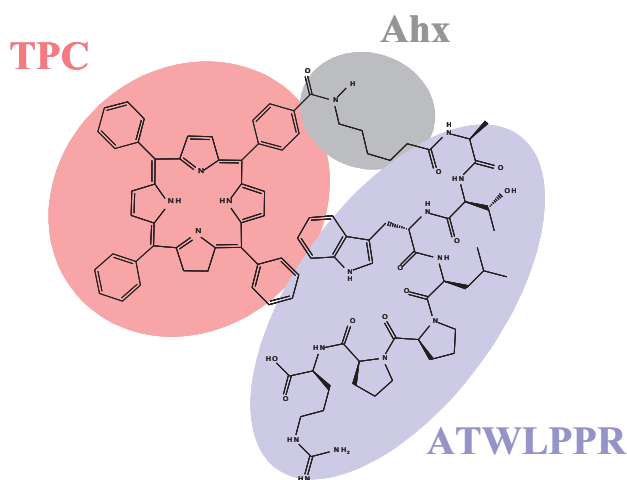


Figure 18 : TPC [5-(4-carboxyphényl)-10,15,20-triphénylchlorine] (rouge) couplée au peptide ATWLPPR (bleu) par l'intermédiaire d'un bras espaceur (acide hexanoïque) (gris), conjugué noté TPC-Ahx-ATWLPPR, d'après [177].

L'utilisation d'une bibliothèque d'épitopes a permis de mettre en évidence l'affinité de l'heptapeptide ATWLPPR pour un Ac monoclonal anti-VEGF-A₁₆₅ [178]. Binetruy-Tournaire *et al.* ont émis l'hypothèse qu'ATWLPPR avait la possibilité de se fixer à VEGFR-2 au niveau de son site de liaison à VEGF-A₁₆₅ [178]. Quatre ans plus tard, Perret *et al.* ont montré l'affinité du peptide ATWLPPR marqué au ⁹⁹mTc (technétium 99 métastable) pour le récepteur NRP-1 et non pas VEGFR-2 [179]. Nous avons également redéfini le caractère affiné du peptide pour NRP-1 et non VEGFR-2 et confirmé cette observation [177].

Les premières études concernant le conjugué TPC-Ahx-ATWLPPR ont d'abord montré que les caractéristiques photophysiques de la TPC n'étaient pas modifiées par le couplage au peptide [177]. *In vitro*, l'accumulation du conjugué TPC-Ahx-ATWLPPR était 25 fois supérieure à celle de la TPC seule dans les cellules HUVEC qui surexpriment les récepteurs NRP-1 et VEGFR-2. L'étude de l'efficacité photodynamique sur les cellules HUVEC a montré une amélioration d'un facteur 10 de l'activité photodynamique du conjugué comparée à celle de la TPC seule. De plus, l'incorporation cellulaire du conjugué est sélective des cellules surexprimant NRP-1 [54].

Suite aux résultats prometteurs obtenus *in vitro*, l'étude *in vivo* de TPC-Ahx-ATWLPPR a été initiée sur un modèle de gliome malin humain (lignée U87), xénotransplanté ectopique chez la souris *nude* [54]. Dans des conditions optimales déterminées par une méthodologie de plans d'expérience, l'efficacité photodynamique du conjugué a induit un retard de croissance tumorale statistiquement significatif comparé au photosensibilisateur non couplé. Le ciblage vasculaire du composé TPC-Ahx-ATWLPPR a été confirmé *in vivo* par colocalisation du conjugué avec les cellules endothéliales tumorales [54]. Cette colocalisation n'a pas été observée pour la TPC seule. L'efficacité anti-vasculaire du conjugué a été caractérisée par une diminution du flux sanguin tumoral d'environ 50 % durant le traitement ; une induction de l'expression du facteur tissulaire suivie par la mise en place de la cascade de coagulation ont été observées [54]. Les résultats pharmacocinétiques après l'injection de TPC-Ahx-ATWLPPR par voie i.v., ont montré que le photosensibilisateur conjugué au peptide se concentrait dans la tumeur à des taux bien supérieurs à ceux retrouvés dans la peau [180]. Cependant 4h après l'injection, la portion peptidique du conjugué a été retrouvée dégradée dans le plasma, sous la forme TPC-Ahx-A [181]. Cette dégradation est très rapide (dans les deux heures) dans les organes du SRE.

L'identification du site de dégradation au niveau du peptide a permis d'envisager l'élaboration à partir d'ATWLPPR de pseudopeptides biologiquement plus stables, sur lesquels j'ai travaillé durant ma première année de thèse.

IV. Intérêt des peptides biologiquement plus stables

L'article *Stability of peptides and therapeutic success in cancer* publié dans le journal *Expert Opinion on Drug Metabolism* traite de la distribution et du métabolisme des peptides ainsi que des stratégies employées pour éviter la dégradation peptidique dans l'organisme [2].

L'utilisation d'agents thérapeutiques d'origine peptidique présente des limites du fait :

- Du temps de demi-vie court du peptide dans l'organisme. Le peptide est rapidement dégradé par les peptidases de l'organisme.
- De leur flexibilité conformationnelle qui induit un manque de sélectivité du peptide pour ses cibles.
- De sa faible biodisponibilité. Les peptides sont généralement hydrophiles et ont peu d'aptitude à traverser les barrières physiologiques.

Dans l'organisme, la barrière hémato-encéphalique (BHE) et la barrière intestinale sont les principaux « obstacles » tissulaires impliqués dans la dégradation enzymatique des peptides. La BHE contient de nombreuses enzymes responsables de la dégradation des neurotransmetteurs et neuromodulateurs. De plus, elle représente une véritable barrière physique au passage des molécules vers le cerveau. La bordure en brosse intestinale possède également de nombreuses enzymes dont le rôle est de dégrader les peptides en acides aminés capables de traverser les cellules épithéliales intestinales par des transporteurs spécifiques. De nombreux autres tissus de l'organisme possèdent les enzymes nécessaires à la dégradation peptidique (foie, reins, rate, tumeur...).

Les endo- et exopeptidases impliquées dans la dégradation de peptides sont spécifiques de substrats et particulièrement de liaisons amides entre deux acides aminés donnés. Cette connaissance a permis de développer des dérivés peptidiques biologiquement plus stables, possédant des modifications chimiques stratégiquement introduites au niveau du site identifié de clivage peptidique. Ces modifications permettent à la fois :

- de garder la séquence en acides aminés du peptide pour préserver sa reconnaissance par ses transporteurs spécifiques et ses récepteurs ;
- de modifier chimiquement uniquement la liaison amide reconnue par les peptidases ;
- de rigidifier la conformation tridimensionnelle du peptide pour augmenter sa spécificité de ciblage.

Plusieurs classes de dérivés peptidiques ont ainsi été développées et ont montré leur efficacité et leur intérêt thérapeutique.

Stability of peptides and therapeutic success in cancer

Marlène Pernot, Régis Vanderesse, Céline Frochot, François Guillemin & Muriel Barberi-Heyob[†]

[†]Nancy-University, Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Centre Alexis Vautrin, Brabois, France

Introduction: Although naturally occurring peptides have been widely used as drugs, their rapid *in vivo* degradation by proteolysis and their interactions at multiple receptors are part of the reason for the limitation of their clinical applications.

Areas covered: This paper reviews peptide-metabolizing enzymes in the brain and intestinal brush-border membranes, and discusses potential strategies to improve biological activity, specificity and stability of peptides. The reader will gain, via some examples, an appreciation of the challenges involved in identifying peptides stability to improve their biological properties such as selectivity.

Expert opinion: Due to the metabolic process, it is crucial to follow the bio-distribution of a peptide drug and/or a peptidic moiety in order to improve its biological properties such as selectivity. To these purposes, pseudopeptides and peptidomimetics preserving the biological properties of native peptides have been developed to increase their resistance to degradation and elimination, bioavailability and selectivity to become good drug candidates.

Keywords: BBB, intestinal barrier, modified peptide, peptide, peptide stability, peptide-metabolizing enzymes, structure-activity relationship

Expert Opin. Drug Metab. Toxicol. (2011) 7(7):1-10

1. Introduction

During the last decade, proof of principle that peptides could be used successfully for *in vivo* targeting of human cancers has been demonstrated. The challenge was to identify simple molecules that have a potential to localize and treat human neoplasms. Peptides are molecules consisting of several amino acids linked together through amide bonds. Peptides differ from proteins, which are also long chains of amino acids, by virtue of their size, the informal dividing line being at ~ 50 amino acids in length. In contrast to proteins, peptides generally do not possess a well-defined three-dimensional (3D) (tertiary) structure [1]. Moreover, peptides not only exist in natural form but also can be designed synthetically and modified. In addition, the effective tissue penetration of short synthetic peptides, in combination with their selective binding and internalizing capacity by cancer cells, make peptides ideal candidates for the delivery of therapeutic agents [2]. Peptides are usually rapidly excreted from the body. This occurs through renal or hepatobiliary excretion or both, depending on the peptide and the type of structural modifications performed on it. One of the main reasons for the increasing interest in peptides for anti-cancer strategy is the possibility of receptor targeting, these receptors being often overexpressed in many human cancers. Moreover, peptides have virtually no cytotoxicity and they are most often agonists for their targeted receptors, which confers the internalization. However, despite their numerous advantages over other molecules (e.g., antibodies and proteins), the main disadvantage of peptides is related to their natural structural conformation which makes them extremely sensitive to

Article highlights.

- Numerous peptide-metabolizing enzymes have been mainly identified in brain and other tissues such as intestinal brush-border membranes.
- Transepithelial transport of peptides have reported an electrochemical gradient of H⁺ playing a major role in di/tripeptide absorption across the apical membrane of the intestinal cell.
- The brain–blood barrier expresses a *plethora* of enzymes capable of metabolizing many neuromodulators including peptides.
- It appears essential to determine the amino acids which are responsible of the affinity and the activity.
- Chemical modifications of peptides introduced strategically at potential enzymatic cleavage sites may dramatically increase the *in vivo* stability of drug candidate peptides.

This box summarizes key points contained in the article.

endo and exopeptidases present in most tissues (Table 1) [3]. It is well known that, following their *in vivo* administration, peptides are progressively cleared and/or metabolized into active or inactive metabolites. Their rapid *in vivo* degradation by proteolysis and their interactions at multiple receptors are part of the reason for the limitation of their clinical applications. A variety of proteases are present in human plasma, including both exopeptidases and endopeptidases [4,5].

Numerous peptide-metabolizing enzymes have been mainly identified in brain and other tissues such as intestinal brush-border membranes. Except for the normal blood–brain barrier (BBB), peptides are characterized by an interesting permeability, leading to an easy and rapid access to the tumor after systemic injection. However, peptides may be able to penetrate through the BBB when the latter is disturbed, as described for glioblastomas [6]. The differentially expressed cell surface markers on endothelial cells in angiogenic vessels of tumors are also excellent targets. This article reviews the *in vivo* biodistribution and metabolism of various peptides and potential strategies to improve their biological activity, specificity and stability.

2. Distribution and metabolism

The main limitations generally attributed to therapeutic peptides are: i) a short half-life because of their rapid degradation by proteolytic enzymes of the digestive system and blood plasma and rapid removal from the circulation by the liver (hepatic clearance) and kidneys (renal clearance), ii) high conformational flexibility, resulting sometimes in a lack of selectivity involving interactions with different receptors or targets (poor specific biodistribution), causing activation of several targets and leading to side effects; eventual risk of immunogenic effects, iii) low oral bioavailability and poor ability to cross physiological barriers because of their general hydrophilicity. However, cell-penetrating peptides (CPPs)

are highly charged peptides and they are permeant, illustrating that hydrophilicity is not always the problem for permeability. The unifying feature among the most known CPPs is the presence of several lysines or arginines within the individual peptide motifs. Indeed, the high positive net charge of CPPs leads to an increased local peptide concentration at the cellular membranes driven by electrostatic interactions [7,8]. Moreover, it seems that positively charged peptides cross membranes because their positive charges interact with phosphates of lipid heads, then their hydrophobicity helps their insertion in membranes at the contrary for negatively charged peptides. Recent progress in the field has shown CPPs to be effective for *in vivo* delivery with retained biological activity of the wide variety of bioactive cargoes [9].

Depending on the position of the cleaved peptide bond, proteases are referred to as exopeptidases or endopeptidases (Figure 1). Exopeptidases specifically cleave substrates at the N-terminal or C-terminal *termini* of polypeptides, and therefore can be subdivided into aminopeptidases and carboxypeptidases. Endopeptidases (also called proteinases) break peptide bonds in the middle of the molecule. They can be subclassified based on their catalytic mechanism, which is related to the chemical group involved in the process of hydrolysis. There are ~ 560 human and 640 mouse proteases, which on the basis of their catalytic mechanism, can be subdivided into five distinct classes: the aspartic-, cysteine-, threonine-, serine- and metallo-proteinases.

In the body, the BBB and the intestinal barrier are the most important tissues involved in the enzymatic peptide degradation due to wild variety of enzymes present there. This part of the review will discuss these tissues and the different enzymes they possess, latter focusing on the processes of peptide degradation undergoing in the whole-body tissues. After intravenous (i.v.) injection, the peptide drug is a vehicle via the blood to the BBB, which is the only barrier between the whole body and the brain. BBB helps to maintain a constant internal environment for the brain by regulating the passage of substances between the general circulation and the brain tissue. Its principal site is the endothelial cell layer of blood capillaries supplying the brain. These cells have been shown to be joined by tight junctions forming *zona occludens* around each cell, contrary to systemic capillaries. This continuous physical barrier prevents nonspecific intercellular transport. Intracellular or transcellular transport is the principal route in and out of the CNS. The BBB exhibits a low permeability to hydrophilic substances such as small ions that do not have specific transport mechanisms [10]. Hydrophobic substances, because of their high lipid solubility, can generally diffuse freely across the barrier. The BBB appears to contain a battery of enzymes capable of metabolizing many neurotransmitters or neuromodulators including peptides. Some of these enzymes are detailed in Table 2. Among them, aminopeptidases, dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) and peptidyl dipeptidase A are also found in the intestinal barrier as described below.

Table 1. Advantages and disadvantages of peptides.

Advantages	Disadvantages
Small molecules	Potentially degraded by endo and/or exopeptidases
Good tissue permeability	Do not cross a normal blood-brain barrier
Virtually no cytotoxicity	Too rapid clearance
Rapid access to the tumor site	
Cross a disturbed blood-brain barrier	
Low antigenicity	
Easy to synthesize	
Easy to modify chemically	
Easy to link to spacer	
Easy to link to chelators	
Easy to radiolabel	
High-affinity receptor binding	
Rapid clearance from the body	
Agonists for their targeted receptor (internalization)	

It is well established that drugs targeting the brain should cross the physical and the metabolic barrier which is the BBB. Morphiceptin and endomorphins are the greater studied peptide drugs targeting the brain [11,12]. The most important structural elements common for morphiceptin and endomorphins are a tetrapeptide sequence, an amide group at the C terminus and a Pro residue in position 2. Morphiceptin has been shown to elicit strong supraspinal antinociception when given intracerebroventricularly. This effect is not observed after peripheral administration due to relatively rapid degradation of morphiceptin. Morphiceptin and endomorphins are good substrates for DPP IV because of their Pro residues. They also satisfy the substrate requirements of proline-specific amino peptidases, such as aminopeptidase P and aminopeptidase M.

The brush-border membrane-associated peptidases also play a crucial role in the assimilation of peptides because these enzymes are responsible for hydrolysis of large peptide fragments in the intestinal lumen to yield transportable amino acids and small peptides. *Per os*, peptides first cross the stomach and the gut into which enzymes and acidic pH make them to be attacked. The first barrier to be passed in this way is the intestinal epithelium. The intestinal mucosa also represents a significant barrier to the oral delivery of peptides into the systemic circulation. The barrier characteristic of intestinal mucosa cells arises because of the tight intercellular junctions and the abundance of peptidases associated with the brush-border membrane and the cytoplasm which rapidly metabolize peptides to their constituent amino acids [13]. The peptidases of the brush-border membrane are numerous and exhibit substrate specificities. To illustrate that, assimilation of dietary peptides occurs in two steps: i) hydrolysis of the

peptides by peptidases and ii) absorption of the hydrolytic products via specific transport mechanisms. The intestinal stability of some peptides has been studied using the Caco-2 cells monolayer. This model allows differentiating the two sides of the intestinal barrier: the apical (AP) side in the lumen, and the basolateral (BL) side. This cell monolayer is a model for both a metabolic and a physical barrier to the transcellular transport of peptides. DSIP (H-Trp-Ala-Gly-Gly-Asp-Ala-Ser-Gly-Glu-OH), an endogenous nonapeptide reported to be useful in the treatment of insomnia, pain and the symptoms of withdrawal from alcohol and opiates, is known to permeate the BBB both *in vitro* and *in vivo*. It is degraded in Caco-2 cells by aminopeptidases, DPP IV and even peptidyl dipeptidase A [14], the major and minor metabolites being Trp and Trp-Ala, respectively. These enzymes are expressed at higher levels on the AP side than on the BL side of the Caco-2 cell monolayer. The DPP IV enzyme plays an important role in the gut. Morita *et al.* [15], using *in vivo* intestinal perfusion methods, have demonstrated that DPP IV was the major enzyme responsible for the hydrolysis of the proline-containing tetrapeptide Leu-Pro-Gly-Gly in the rat jejunum. Tiruppathi *et al.* [13] found that the ability to hydrolyze and absorb peptides of X-Pro-Y type *in vivo* is greatly reduced in DPP IV-negative animals, they concluded that DPP IV plays a functional role in the intestinal assimilation of proline-containing peptides [13].

Numerous studies on the metabolism and transepithelial transport of peptides have also reported an electrochemical gradient of H⁺ playing a major role in di/tripeptide absorption across the apical membrane of the intestinal cells [16-18]. For example, an H⁺/dipeptide cotransport system is implicated in the transepithelial transport of small peptides whereas Na⁺ gradient is generally involved in cotransport across membranes [18]. However, it is not clearly established that the same mechanism happens in the basolateral side of the epithelium. Inui *et al.* [17] hypothesized that the basolateral transport of cephadrine in the Caco-2 cells may be mediated by a temperature-dependent system. In their study, Thwaites *et al.* [16] concluded that under optimal conditions for dipeptide transport, Gly-Sar (Sar for Sarcosine or *N*-methylglycine) flux was associated with H⁺ flow across both apical and basolateral membranes. Therefore, the energy source for dipeptide accumulation/transport consists of the pH gradient and the transmembrane electrical potential difference. Moreover, it is established that the epithelial transporters display substrate specificity. Tamura *et al.* [19] demonstrated that the substitution of a D-amino acid, or more, into the tripeptide (H-Val-Val-Val-OH) lowers the affinity of the molecule for the apical oligotransporter(s), depending on the location of the D-amino acid in the molecule. They have also reported that the tripeptide L-isomer showed very low or no intracellular accumulation due to their metabolic lability, whereas the D-Val-L-Val-L-Val, which interacts with the apical oligopeptide transporter(s) strongly and is metabolically stable in Caco-2 cell system, showed significant cellular accumulation.

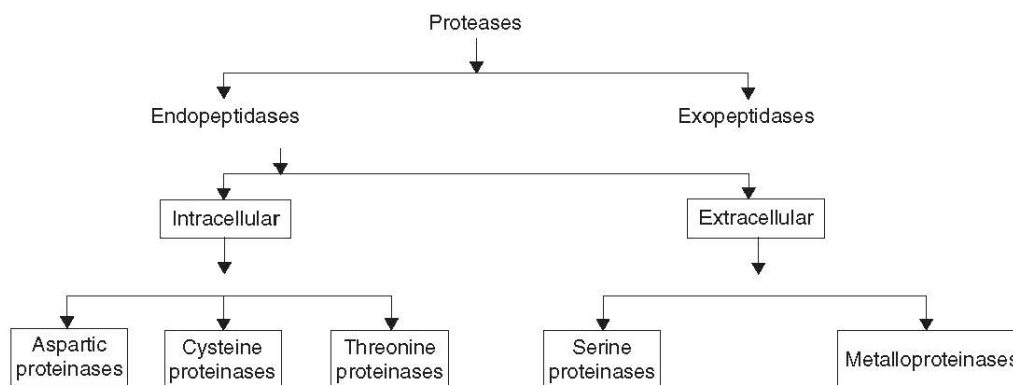


Figure 1. Summary of different proteases.

Table 2. Blood-brain barrier enzymes responsible for peptide degradation.

Enzymes	Activities	Ref.
Aminopeptidase M	Cleaves either the first or the second peptide bond of peptide chains to release the N-terminal amino acid or dipeptide	[29]
	When the N-terminal hydrophobic residue is followed by a Pro, the two amino acids may be released as an intact dipeptide	[30]
Aminopeptidase A	Cleaves only N-terminal acidic amino acids, i.e. Asp and Glu	[29]
Carboxypeptidase Y	Accepts a broad spectrum of substrates and does not require a free C-terminal carboxyl group	[31]
	Exhibits preference for peptides containing hydrophobic C-terminal amino acid residues (except Pro)	[32]
	The C-terminal amide group underwent hydrolysis to yield a free acid; then, the second step cleavage of the C-terminal amino acid took place	[31]
ACE = peptidyl dipeptidase	Hydrolyses dipeptides sequentially from the C-terminal of an oligopeptide	[29]
	Displays endopeptidase activity	[33]
Endopeptidase 24.11 = neutral endopeptidase = enkephalinase	Has broad substrate specificity, cleaving on the amino side of hydrophobic residues	[29]
DPP IV	Removes N-terminal dipeptides from peptide substrates, primarily those with a penultimate prolyl residue, provided that the third residue is not Pro, and with little regard for the identity of the N-terminal residue	[29,31]
	Also accepts peptides with an Ala residue at position 2 as substrate	[29]
	Requires a <i>trans</i> configuration at the non-scissile X-Pro position of its substrates, in addition to a protonated N terminus	[34]
Proteinase A	Cleaves small peptide acids or amides at only one site	[31]

ACE: Angiotensin-converting enzyme; DPP IV: Dipeptidyl peptidase IV.

Passive diffusion allowing passage between cells is also observed in the transepithelial transport of peptides. This transport way depends on the size and the charge of the peptide. Some junction complexes are negatively charged, so a negatively charged peptide should be less able to permeate than neutral and positively charged peptide [19].

Peptide metabolism also occurs in tissues other than the BBB and the intestinal barrier. It is indeed well known that, following *in vivo* administration, a drug is progressively cleared and/or metabolized into active or inactive metabolites. Some organs such as liver, spleen and kidneys participate essentially in this process. These organs are parts of the reticuloendothelial system. Because of this metabolic process,

it is very important to study the future of a drug, and specially a peptide drug, in the whole body as peptide moieties are particularly sensitive to endo and exopeptidases present in most tissues. Unfortunately, very few studies describe the *in vivo* stability of synthetic peptides and conjugated peptides. Our group synthesized a new peptide-conjugated photosensitizer (photosensitizer-ATWLPPR) having affinity for endothelial cells of the tumor neovasculature by targeting the vascular endothelial growth factor (VEGF₁₆₅) receptor, neuropilin-1 (NRP-1) [20]. The metabolic study of this compound revealed the appearance of a metabolic product photosensitizer-A in the plasma after *i.v.* injection [21]. However, the C terminus arginine of the ATWLPPR peptide

has been shown to be essential for the affinity of NRP-1 [22]. Therefore, the degradation of the peptidic moiety of the molecule would impair the selectivity of the conjugate and would both allow it to accumulate in normal tissues, where the activated photosensitizer could exert non-desirable effect and decrease the amount of photosensitizer delivered to targeted diseased tissues. After having discarded any role of the plasma peptidases in the degradation phenomenon, we studied the tissue distribution and pharmacokinetics of the conjugate in glioma-bearing nude mice [23]. Following i.v. injection, our results showed an accumulation of the photosensitizer-ATWLPPR in the highly perfused tissues such as liver, spleen and kidneys, which accumulate higher levels of this conjugate than the peripheral tissues like skin and muscle. In the organs of the reticuloendothelial system, photosensitizer-ATWLPPR was rapidly degraded, and the major part of the hydrolysis of the peptide bond between the Ala and Thr residues occurred in the liver. Some degradation also occurred quite rapidly in the tumor, less than in metabolic organs but more than in plasma. The degradation product was then released into the bloodstream.

3. Strategies to improve peptide biological activity, specificity and stability

It is now well established that peptide stability depends on the primary and secondary structure of the peptide itself. However, these structures are also involved in the biological potency, selectivity and the membrane barrier permeability of peptides. Consequently, it appears crucial to obtain structural data and to identify the portion(s) of the molecule responsible for the biological activities. A number of structure-activity relationship studies have been carried out on peptides with different techniques [24-30]. These structure-activity relationship investigations enabled successful development of efficacious therapeutic candidate peptides (Figure 2).

To identify peptide conformation, various techniques have been suggested such as circular dichroism (CD) spectral analyses [24,25], NMR [24,26], and computational evaluation [27]. Figure 3 illustrates the different steps classically followed for determining the conformation of free peptides and bound peptides. CD spectroscopy measures differences in the absorption of left-handed polarized light versus right-handed polarized light which arise due to intrinsic asymmetry of the peptide. The absence of regular structure results in zero CD intensity, while an ordered structure results in a spectrum which can contain both positive and negative signals. Even more important is that a secondary structure will also impart a distinct CD to its respective molecules. α -Helix, β -sheet, and random coil structures each give rise to a characteristic shape and magnitude of CD spectrum. Like all spectroscopic techniques, the CD signal reflects an average of the entire molecular population. In general, after initial CD studies, a standard strategy is followed using homonuclear two-dimensional ^1H NMR techniques. COSY (CORrelation

Spectroscopy) experiments allow the determination of the connectivity of a molecule by determining which protons are spin-spin coupled. TOCSY (TOtal CORrelation Spectroscopy) creates correlations between all protons within a given spin system (i.e., each amino acid), but not with protons of other residues. This is extremely useful for identifying protons of amino acids. NOESY differs from COSY or TOCSY in the respect that Nuclear Overhauser Effect (NOE) is observed through space, not through bonds. Thus, all atoms that are in proximity to each other give a NOE. Furthermore, the distance can be derived from the observed NOEs, so that the precise, 3D structure of the molecule can be reconstructed (Figure 4). TRansferred Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy (TR-NOESY) is usually suggested to analyze conformations of peptides bound to protein receptors by molecular modeling. Another computational tool is the docking which predicts the preferred orientation of one molecule to a second when bound to each other to form a stable complex [31].

After the sequence identification and the conformational studies of the peptide, it is important to determine the essential amino acids, which are responsible for the affinity and the activity. These studies are accomplished by characterizing the *in vitro* and *in vivo* pharmacological effects of i) analogs truncated sequentially at the N and C termini, ii) analogs systematically modified with single Ala substitutions (Ala scanning), and iii) analogs modified with D-amino acid substitutions (D-amino acid scanning). Site-directed modification through single-point Ala or D-amino acid substitutions is a useful way to determine the contribution of each side chain of a peptide. This way determines the role of each amino acid and of their conformational impact [28,29]. Once the important amino acids identified, it should be possible to enhance the biological potency of a specific compound by increasing binding energy at these positions. This information may allow improving the peptide stability by modifying its sequence without changing the side chain of the essential amino acids and the general conformational structure necessary for the potency. Another primordial point is to identify the amide bond(s) responsible for the peptide degradation [30]. The identification of potential cleavage site in the peptide sequence is a requirement for the rational design of chemical modifications to improve enzymatic stability. One technique is to administrate the peptide *in vivo* to a rodent and to study its bioavailability in different organs such as plasma, liver, kidneys, spleen and skin. A better and more commonly used experimental system is incubation of the drug candidate *in vitro* with different tissue homogenates and membrane preparations as well as with plasma and serum. The degradation products can be monitored by HPLC and identified by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectroscopy. Then, the amide bond cleaved could be chemically modified to improve the peptide stability. Using this approach, our group examined the *in vitro* and *in vivo* stability of photosensitizer coupled to

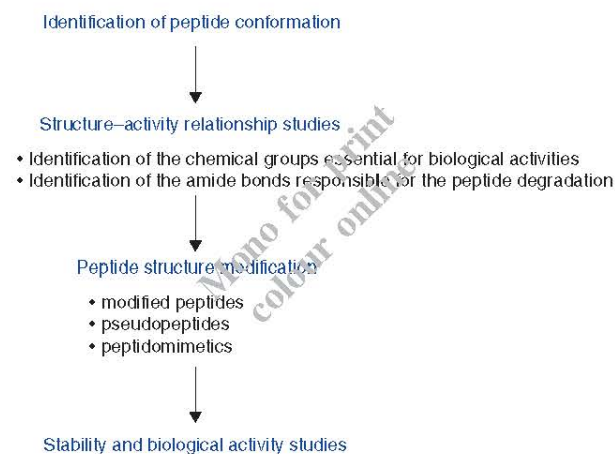


Figure 2. Structure-activity relationship investigations to develop efficacious therapeutic candidate peptides.

ATWLPPR (photosensitizer-ATWLPPR) by HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry [21,23]. We identified the major site of degradation between A and T amino acids. Photosensitizer-A was identified as the main metabolic product and biodistribution associated with pharmacokinetics studies suggested that its appearance in plasma mainly resulted from the degradation of the peptidic moiety into organs of the reticuloendothelial system. According to *in vitro* cell culture experiments, photosensitizer-ATWLPPR was also significantly degraded after incorporation in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs), mainly into photosensitizer-A and, to a lesser extent, into photosensitizer-AT and photosensitizer-ATWLPP. The conjugate was mostly localized into lysosomes and, when HUVEC were treated with the lysosomal enzymes inhibitor, a significant decrease in the peptide degradation was measured [21].

To develop a peptide as a therapeutic agent, its biological effect, pharmacokinetic profile and low immunogenicity are crucial parameters. Therefore, various chemical strategies have been developed to increase their *in vivo* plasma residence time. In fact, from a model peptide of interest, it is often necessary to optimize its chemical structure to obtain a compound that can be used therapeutically, even for parental administration. Chemical modifications of peptides introduced strategically at potential enzymatic cleavage sites may dramatically increase the *in vivo* stability of drug candidate peptides [3]. Furthermore, peptides are flexible biopolymers, the structure and conformation of which are strongly influenced by the nature of constituent amino acids and also the biochemical environment in which they exist. However, this high conformational flexibility presents a potential problem in generating therapeutics and biological probes since a peptide must attain a certain conformation in order to bind to its biological target, be it a receptor or an enzyme. Therefore, the pre-organization of peptide shape, via the introduction of a structural motif that imparts conformational

restriction, can enhance binding and hence therapeutic potential. An entropic advantage is also introduced by such a pre-organization into a known biologically active conformation. Adessi and Soto [3] classified the peptide derivatives into three main groups according to the importance of the chemical modifications to the original sequence, going from relatively conservative substitutions to more drastic modifications (Table 3).

The design of amide surrogates as pseudopeptide links provides the opportunity of modulating separately the backbone and the side chains in peptide analogs, and thus of adapting the conformation of the backbone with retention of the side chains which may be essential for bioactivity. These derivatives can be considered as peptides in chemical nature. This group includes a wide variety of chemical modifications: N and C termini modifications, cyclization, alkylation of amide nitrogen, side-chain modifications and chirality changes. The potential use of irreversible synthetic inhibitors (covalently bound) such as peptide chloromethyl ketones or peptide aldehydes, peptide boronic acids has been widely applied in the treatment of several diseases such as AIDS or rheumatoid arthritis. The reduced flexibility of the cyclic structures often would further insight into the development of optimized conformations for receptor targeting. Intracellular protein-protein interactions that govern many biological pathways are frequently mediated by α -helical structures of protein; however, the use of short peptides leads to a loss of secondary structure, such as α -helical structure. Short peptides also are easily degraded by proteolysis and have difficulty in intact cells penetration. Stapled peptides are synthetically locked, or 'stapled', into an α -helical shape with an optimized cross-linking chemistry to mimic the structure found at the interface of many protein-protein interactions [32]. These stapled peptide drugs may endow with unique properties, including efficient cell penetration, high affinity binding to large target protein surfaces, and also excellent stability and pharmacokinetic properties within the body. To synthesize the stapled peptide, unnatural amino acids containing olefin groups (e.g., (S)- α -(2'-pentenyl)alanine) were introduced with separations of three or six residues to ensure that the staple was on one side of the helix (substitution positions i and $i + 4$) or (i and $i + 7$) amino acids within the peptide. The peptide was exposed to ruthenium catalyzed cross-linking conditions to promote olefin metathesis. CD studies may confirm that the stapled peptides showed increase in helical content compared with the unstapled. This strategy was successfully used for developing different potent peptide inhibitors such as hydrocarbon double-stapling of natural peptide HIV-1 inhibitor and improving its bioavailability [33], as well as for design of α -helical stapled peptides and development of potent inhibitors of α -helical protein-protein interfaces [34-36]. Hydrocarbon stapling may provide a useful strategy in researching experimental and therapeutic modulation of protein-protein interactions as well as in *in vivo* pharmacokinetics studies. The pseudopeptides contain

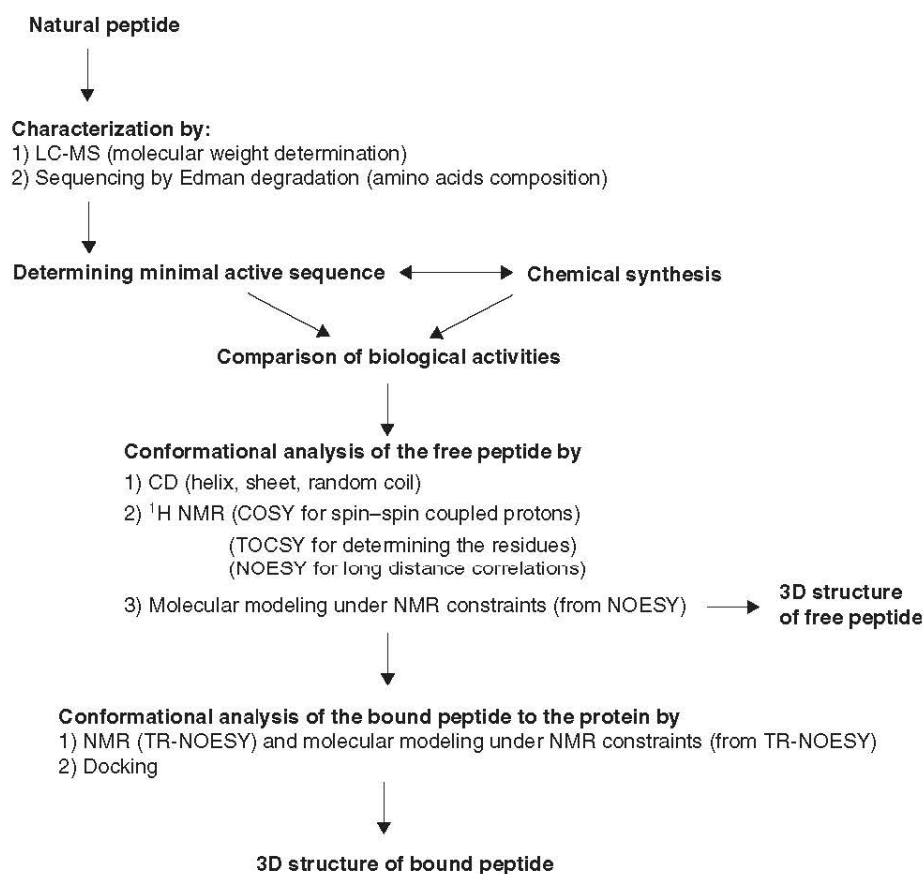


Figure 3. Classical spectroscopic techniques used to elaborate new peptides.

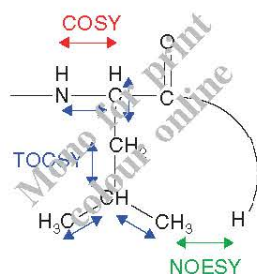


Figure 4. Summary of homonuclear two-dimensional (2D) ^1H NMR techniques.

COSY: Correlation spectroscopy; NOESY: Nuclear overhauser effect spectroscopy; TOCSY: Total correlation spectroscopy.

modified amide bonds consisting in the replacement of some chemical groups. Pseudopeptide is one of the most important lead structures. Their chemical nature is partially a peptide. The definition of pseudopeptides comprises amide bond surrogates, peptoids, azapeptides and azatides. Various pseudopeptides could be prepared either based on the structures or based on the action mechanisms. The use of non-hydrolyzable

amide isosteres is an established approach to overcome one of the major drawbacks in the use of peptides as therapeutic agents, namely, their rapid degradation by peptidases. Among these peptide bond replacements, one of the simplest is the reduced peptide bond (CH_2NH), which has been widely and successfully used in the design of metabolically stable agonists or antagonists of natural peptides, or enzyme inhibitors [37,38].

For example, our group suggested the synthesis of two modified peptides (aTWLPPR where a is (*R*)Ala, A Ψ [CH_2NH]TWLPPR, where the amide bond between A and T residues was replaced by a $-\text{CH}_2\text{NH}-$ bond) to circumvent the degradation of the peptide moiety ATWLPPR [38]. We validated the chemical identity and the photophysical characteristics of these new conjugates and demonstrated by competitive binding experiments that these pseudopeptides and conjugates described an affinity for the targeted receptor NRP-1. Taking advantage of RNA silencing techniques, we have selectively silenced NRP-1 expression to provide the evidence for the involvement of NRP-1 expression in the conjugate cellular uptake. Peptide-conjugated photosensitizer allowed a selective accumulation into cells. In mice, no degradation was observed in plasma *in vivo* 4 h after i.v.

Table 3. Different types of peptide derivatives or surrogates classified according to degree of modification.

Names	Examples	Targets	Applications	Ref.
<i>Modified peptides</i>				
End modification	Boronic acid (Bortezomib or Velcade®) CMK	26S proteasome HLE	Multiple myeloma Rheumatoid arthritis	[7] [8]
Cyclization	Cyclo(RGDfK)	Integrin $\alpha_v\beta_3$	Cancer	[9,10]
Chirality change(s)	N-terminal sequence of HIV-1 gp41	HIV-1 capsid protein	AIDS	[11]
N-alkylation	iA β 5p analogous morphiceptin and endomorphin analogous	Glycoprotein μ -Opioid receptor	Alzheimer's disease mediated analgesia	[12] [13,14]
<i>Pseudopeptides</i>				
Reduced peptide	ATWLPPR Val-Asn-Phe analogous	NRP-1 and NRP-2 β -Secretase (BACE-1)	Cancer Alzheimer's disease	[15] [16]
Retro-inverso peptide	Prosaptide RGKLVFFGR analogous	Prosaposin receptor β -Amyloid protein	CNS disorders Alzheimer's disease	[17,18] [19]
Azapeptide	BMS-232632	HIV-1 protease	AIDS	[20]
Hydroxyethylamino	Ritonavir, indinavir, nelfinavir	HIV-1 protease	AIDS	[21]
<i>Peptidomimetics</i>				
Cyclic imide	Bestatin analogous	APN/CD13	Cancer	[22]
Lactams	pYLKTKF analogous	STAT3	Cancer	[23]
β -Turn-like inducer				[24]
γ -Turn-like inducer				[25]

APN: Aminopeptidase; CMK: Chloromethyl ketone; HLE: Human leukocyte elastase; NRP: Neupilin; STAT: Signal transducer and activator of transcription.

injection by MALDI-TOF mass spectrometry. This study drew attention to this potential problem with peptides, especially in the case of targeting strategies, and provided useful information for the future design of more stable molecules [38].

In peptoids, the side chain that is attached to the α -carbon in peptide structure is 'switched' by one position to the amide nitrogen. Azapeptides and azatides are molecules in which one or more α -carbon atoms are replaced by nitrogen atoms. The peptidomimetics, which are small molecules designed to convert the information contained in peptides into small non-peptide compounds. These surrogates can induce conformational restrictions as β - or γ -turn-like secondary structures mimic compounds with conformationally constrained templates. Ripka and Rich [39] classified the peptide mimetics into three types. The first one is structure that mimics the local topography about an amide bond. The type 2 mimetic is a small non-peptidic molecule that binds to a peptide receptor. The last one represents the ideal in peptide mimetics in that they possess novel templates which, through appearing unrelated to the original peptides, contain the necessary groups positioned on a novel non-peptidic scaffold to serve as topographical mimetics.

4. Expert opinion

In general, cancer chemotherapy is accompanied by strong and acquired drug resistance, and therapeutic agent delivery systems that may selectively deliver the drugs to the target tumor are always awaited. Current efforts are focusing on developing therapeutic agents capable of specifically targeting

cancer cells and also tumor-associated microenvironments. Recently, vascular targeting strategies have become a focus of interest. Indeed, targeting of a tumor angiogenic vasculature appears as a promising cancer treatment since these vessels have properties different from those of the pre-existing systemic vasculature. Furthermore, tumor angiogenic vasculature is thought to be an ideal site for a drug delivery system. Peptide metabolism occurs in different tissues, including the BBB and the intestinal barrier. Following *in vivo* administration, the peptide is progressively cleared and/or metabolized into active or inactive metabolites. Due to this metabolic process, it is crucial to follow the biodistribution of a peptide drug and/or a peptidic moiety in order to improve its biological properties such as selectivity.

One recognized strategy for improving the therapeutic effectiveness of conventional chemotherapeutics is to encapsulate the therapeutic agents into targeting carriers [40]. Targets of the peptides are not only brain tumors and the gastrointestinal tract but also the kidneys, the lungs, the vascular system, etc. One of the main reasons for the increasing interest for peptides in cancer is the possibility of receptor targeting, because the peptide receptors are often overexpressed in cancers, in comparison with their expression in normal tissue adjacent and/or its normal tissue origin. They can be used as targeting agents or as molecular targets in two ways, binding sites for radioligands and targets mediating functional responses [40]. Our strategy using peptides in the field of photodynamic therapy aims to favor the vascular effect by targeting tumor-associated vascularization, using as we saw peptides, pseudopeptides and more recently peptide-functionalized nanoparticles. We designed multifunctional nanoparticles

consisting of a surface-localized tumor vasculature targeting peptides and encapsulated photodynamic therapy and imaging agents. These nanoparticles functionalized with ATWLPPR peptide bound to the NRP-1 targeted receptor [41]. But, we also previously evidenced that the ATWLPPR peptide moiety was mainly concentrated in organs of the reticulo-endothelial system, leading to its *in vivo* degradation [21]. Interestingly, using functionalized nanoparticles eliminated by renal excretion will hence overcome this degradation process.

However, proteases are of a potential interest because of their unique ability to cleave selectively amide bonds in peptides. Proteases have long been considered as ideal therapeutic targets in many disease indications, involving excessive proteolysis, including cancer. Tumor-associated proteases are

known to function at multiple steps of tumor progression, affecting tumor establishment, growth, neovascularization, intravasation, extravasation and metastasis. For example, proteolytic degradation of the extracellular matrix appears crucial for cancer development, invasion and metastasis, all of them associated with increased activities of several different protease families [42,43]. Protease-sensitive prodrugs have attracted interest for bio-responsive drug delivery to sites with up-regulated proteolytic activities [44].

Declaration of interest

The authors state no conflict of interest and have received no payment in preparation of this manuscript.

Bibliography

1. Venkatraman J, Shankaramma SC, Balaram P. Design of folded peptides. *Chem Rev* 2001;101:3131-52
2. Schneider R, Tirand L, Frochot C, et al. Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2006;6:469-88
3. Adessi C, Soto C. Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Curr Med Chem* 2002;9:963-78
4. Mc Donald J, Barrette A. Mammalian proteases: a glossary and bibliography. 1. Endopeptidases. Academic Press, London; 1980
5. Mc Donald J, Barrette A. Mammalian proteases: a glossary and bibliography. 2. Exopeptidases. Academic Press, London; 1986
6. Brigger I, Morizet J, Aubert G, et al. Poly(ethylene glycol)-coated hexadecylcyanoacrylate nanospheres display a combined effect for brain tumor targeting. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;303:928-36
7. Bellel-Amalric E, Blaudez D, Desbat B, et al. Interaction of the third helix of Antennapedia homeodomain and a phospholipid monolayer, studied by ellipsometry and PM-IRRAS at the air-water interface. *Biochim Biophys Acta* 2000;1467:131-43
8. Ziegler A, Blatter XL, Seelig A, Seelig J. Protein transduction domains of HIV-1 and SIV TAT interact with charged lipid vesicles. Binding mechanism and thermodynamic analysis. *Biochemistry* 2003;42:9185-94
9. Jarver P, Mager I, Langel U. In vivo biodistribution and efficacy of peptide mediated delivery. *Trends Pharmacol Sci* 31:528-35
10. Brownlees J, Williams CH. Peptidases, peptides, and the mammalian blood-brain barrier. *J Neurochem* 1993;60:793-803
11. Gach K, do-Rego JC, Fichna J, et al. Synthesis and biological evaluation of novel peripherally active morphiceptin analogs. *Peptides* 2010;31:1617-24
12. Janecka A, Staniszewska R, Gach K, Fichna J. Enzymatic degradation of endomorphins. *Peptides* 2008;29:2066-73
13. Tirupathi C, Miyamoto Y, Ganapathy V, Leibach FH. Genetic evidence for role of DPP IV in intestinal hydrolysis and assimilation of prolyl peptides. *Am J Physiol* 1993;265:G81-9
14. Augustijns PF, Borchardt RT. Transport and metabolism of delta sleep-inducing peptide in cultured human intestinal epithelial cell monolayers. *Drug Metab Dispos* 1995;23:1372-8
15. Morita A, Chung YC, Freeman HJ, et al. Intestinal assimilation of a proline-containing tetrapeptide. Role of a brush border membrane postproline dipeptidyl aminopeptidase IV. *J Clin Invest* 1983;72:610-16
16. Thwaites DT, Brown CD, Hirst BH, Simmons NL. Transepithelial glycylsarcosine transport in intestinal Caco-2 cells mediated by expression of H (+)-coupled carriers at both apical and basal membranes. *J Biol Chem* 1993;268:7640-2
17. Intui K, Yamamoto M, Saito H. Transepithelial transport of oral cephalosporins by monolayers of intestinal epithelial cell line Caco-2: specific transport systems in apical and basolateral membranes. *J Pharmacol Exp Ther* 1992;261:195-201
18. Ganapathy V, Leibach FH. Role of pH gradient and membrane potential in dipeptide transport in intestinal and renal brush-border membrane vesicles from the rabbit. Studies with L-carnosine and glycyl-L-proline. *J Biol Chem* 1983;258:14189-92
19. Tamura K, Lee CP, Smith PL, Borchardt RT. Effect of charge on oligopeptide transporter-mediated permeation of cyclic dipeptides across Caco-2 cell monolayers. *Pharm Res* 1996;13:1752-4
20. Tirand L, Frochot C, Vanderesse R, et al. A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release* 2006;111:153-64
21. Tirand L, Thomas N, Dodeller M, et al. Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: an in vivo and in vitro study. *Drug Metab Dispos* 2007;35:806-13
22. Tournaire R, Demangel C, Derbin C, et al. Peptides blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis polynucleotides encoding said peptides and methods of use thereof. WO0172829; 2001

23. Thomas N, Tirand L, Chatelut E, et al. Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice. *Photochem Photobiol Sci* 2008;7:433-41
24. Sheet T, Banerjee R. Sulfate ion interaction with 'anion recognition' short peptide motif at the N-terminus of an isolated helix: a conformational landscape. *J Struct Biol* 2010;171:345-52
25. Onoue S, Misaka S, Ohmori Y, et al. Physicochemical and pharmacological characterization of novel vasoactive intestinal peptide derivatives with improved stability. *Eur J Pharm Biopharm* 2009;73:95-101
26. Perez DR, Damberger FF, Wuthrich K. Horse prion protein NMR structure and comparisons with related variants of the mouse prion protein. *J Mol Biol* 2010;400:121-8
27. Shaikh N, Russo L, Papaleo E, et al. C-type natriuretic peptide: Structural studies, fragment synthesis, and preliminary biological evaluation in human osteosarcoma cell lines. *Biopolymers* 2010;94:213-19
28. Nicole P, Lins L, Rouyer-Fessard C, et al. Identification of key residues for interaction of vasoactive intestinal peptide with human VPAC1 and VPAC2 receptors and development of a highly selective VPAC1 receptor agonist. Alanine scanning and molecular modeling of the peptide. *J Biol Chem* 2000;275:24003-12
29. Igarashi H, Ito T, Hou W, et al. Elucidation of vasoactive intestinal peptide pharmacophore for VPAC(1) receptors in human, rat, and guinea pig. *J Pharmacol Exp Ther* 2002;301:37-50
30. Adessi C, Frossard MJ, Boissard C, et al. Pharmacological profiles of peptide drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 2003;278:13905-11
31. Lengauer T, Rarey M. Computational methods for biomolecular docking. *Curr Opin Struct Biol* 1996;6:402-6
32. Walensky LD, Kung AL, Escher I, et al. Activation of apoptosis in vivo by a hydrocarbon-stapled BH3 helix. *Science* 2004;305:1466-70
33. Bird GH, Madani N, Perry AF, et al. Hydrocarbon double-stapling remedies the proteolytic instability of a lengthy peptide therapeutic. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:14093-8
34. Guo Z, Mohanty U, Noehre J, et al. Probing the alpha-helical structural stability of stapled p53 peptides: molecular dynamics simulations and analysis. *Chem Biol Drug Des* 75:348-59
35. Pitter K, Bernal F, Labelle J, Walensky LD. Dissection of the BCL-2 family signaling network with stabilized alpha-helices of BCL-2 domains. *Methods Enzymol* 2008;446:387-408
36. Stewart ML, Fire E, Keating AE, Walensky LD. The MCL-1 BH3 helix is an exclusive MCL-1 inhibitor and apoptosis sensitizer. *Nat Chem Biol* 6:595-601
37. Iguchi S, Kawasaki K, Okamoto H, et al. Synthesis of some pseudo-peptide analogs of thiol proteinase inhibitors. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 1999;47:423-7
38. Thomas N, Pernot M, Vanderesse R, et al. Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides with improved stability properties. *Biochem Pharmacol* 2010;80:226-35
39. Ripka AS, Rich DH. Peptidomimetic design. *Curr Opin Chem Biol* 1998;2:441-52
40. Reubi JC. Peptide receptors as molecular targets for cancer diagnosis and therapy. *Endocr Rev* 2003;24:389-427
41. Couleaud P, Bechet D, Vanderesse R, et al. Functionalized silica-based nanoparticles for photodynamic therapy. *Nanomedicine Under Press*
42. Berdowska I. Cysteine proteases as disease markers. *Clin Chim Acta* 2004;342:41-69
43. van Kempen LC, de Visser KE, Coussens LM. Inflammation, proteases and cancer. *Eur J Cancer* 2006;42:728-34
44. Verhille M, Couleaud P, Vanderesse R, et al. Modulation of photosensitization processes for an improved targeted photodynamic therapy. *Curr Med Chem* 2010;17:3925-43

Affiliation

Marlène Pernot¹, Régis Vanderesse^{2,4}, Céline Frochor^{3,4}, François Guillemin^{1,4} & Muriel Barberi-Heyob^{1,4}
¹Author for correspondence
¹Nancy-University, Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne, Brabois, F 54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France
 Tel: +33 3 83 59 83 76; Fax: +33 3 83 59 83 78; E-mail: m.barberi@nancy.fnclcc.fr
²Nancy-University, Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), CNRS, Nancy, France
³Nancy-University, Laboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), CNRS, Nancy, France
⁴GDR CNRS 3049 "Médicaments Photoactivables - Photochimiothérapie (PHOTOMED)", France

V. Validation de l'intérêt des pseudopeptides

Notre article expérimental *Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides with improved stability properties* publié dans *Biochemical Pharmacology* nous a permis de valider l'intérêt du couplage de la TPC avec des pseudopeptides biologiquement plus stables par substitution à ATWLPPR initialement utilisé dans notre approche en VTP (**conf. PARTIE II, III. 3.**) [3].

Après avoir caractérisé la dégradation de la séquence peptidique ATWLPPR entre le résidu alanine et thréonine, en collaboration avec l'équipe du Dr Régis Vanderesse (LCPM, Nancy) nous avons synthétisé deux pseudopeptides :

- aTWLPPR dans lequel le résidu L-alanine a été remplacé par un résidu D-alanine ;
- A Ψ [CH₂NH]TWLPPR présentant une liaison amide réduite entre les résidus alanine et thréonine.

Ces peptides ont été conjugués à la TPC par l'intermédiaire du même bras espaceur qu'à l'initial aboutissant respectivement aux conjugués TPC-Ahx-aTWLPPR et TPC-Ahx-A Ψ [CH₂NH]TWLPPR.

Ces deux conjugués ont présenté les mêmes propriétés photophysiques que le conjugué non modifié TPC-Ahx-ATWLPPR : les bandes Q et bande de Soret étaient caractéristiques de la chlorine. Les rendements quantiques de formation d'¹O₂ et de fluorescence étaient similaires à ceux de la TPC seule.

Les nouveaux conjugués ont présenté une capacité de fixation au récepteur NRP-1, surexprimé dans les cellules endothéliales angiogéniques, et non pas au récepteur VEGFR-2, comme nous le pensions initialement. Cependant, nous avons constaté que le caractère affin du peptide pour NRP-1 demeure diminué suite au couplage avec le photosensibilisateur. Cette diminution peut résulter soit des interactions intramoléculaires entre l'entité peptidique et le groupement photo-activable, soit de l'encombrement stérique de la structure tétrapyrrolique du groupement photo-activable, limitant ainsi la reconnaissance par le récepteur.

L'affinité des conjugués pour NRP-1 a eu pour conséquence une très nette amélioration de l'incorporation de la TPC par les cellules humaines de cancer mammaire

MDA-MB-231 surexprimant ce récepteur. Nous avons également constaté que l'augmentation de l'incorporation des conjugués pouvait en partie résulter de phénomènes non spécifiques. Afin de définir plus précisément la part d'incorporation intracellulaire provenant de mécanismes spécifiques par rapport à celle issue de mécanismes non spécifiques, nous avons comparé ce degré d'incorporation entre des cellules surexprimant NRP-1 (*e.g.* cellules MDA-MB-231) et ces mêmes cellules traitées par ARN interférence. Après avoir confirmé le *knock down* de NRP-1 par *Western Blot* et par RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*), nous avons mis en évidence une diminution significative de l'incorporation cellulaire des conjugués pour la lignée MDA-MB-231 *knock down* comparée à la lignée *wild type* (de phénotype sauvage), confirmant l'implication de NRP-1 dans l'incorporation. Les 3 conjugués TPC-Ahx-ATWLPPR, TPC-Ahx-aTWLPPR et TPC-Ahx-A ψ [CH₂NH]TWLPPR ont présenté des taux d'incorporation cellulaire comparables.

Afin, l'étude de stabilité *in vivo* chez la souris *nude* a révélé la dégradation des peptides ATWLPPR et aTWLPPR entre les résidus alanine et thréonine, 4 heures après l'injection par voie i.v. En revanche, le pseudopeptide A ψ [CH₂NH]TWLPPR est resté stable 4 heures après l'injection par voie i.v.

Les résultats prometteurs obtenus avec les pseudopeptides, et particulièrement A ψ [CH₂NH]TWLPPR, montrent leur intérêt en thérapie. Ces pseudopeptides stables *in vivo* pourront par la suite fonctionnaliser des nanoparticules multifonctionnelles pour la PDT.

Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudo-peptides with improved stability properties

Noémie Thomas^a, Marlène Pernot^a, Régis Vanderesse^{b,f}, Philippe Becuwe^c, Ezatul Kamarulzaman^b, David Da Silva^d, Aurélie François^a, Céline Frochot^{e,f}, François Guillemain^{a,f}, Muriel Barberi-Heyob^{a,f,*}

^aCentre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), Nancy-University, CNRS, Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre-lès-Nancy, France

^bLaboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), Nancy-University, CNRS, Nancy, France

^cEA 4421 SIGReTO, Nancy-University, Vandœuvre-lès-Nancy, France

^dLaboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, Institut Jean Barriol - Fédération de Recherche 2843, Paul Verlaine-University, Metz, France

^eLaboratoire Réactions et Génie des Procédés (LRGP), Nancy-University, CNRS, Nancy, France

^fGDR CNRS 3049 "Médicaments Photoactivables - Photochimiothérapie (PHOTOMED)", France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 January 2010

Accepted 31 March 2010

Keywords:

Targeted photodynamic therapy

Pseudo-peptide

Neuropilin-1

siRNA

Affinity

In vivo stability

ABSTRACT

The general strategy developed aims to favor the vascular effect of photodynamic therapy by targeting tumor vasculature. Since angiogenic endothelial cells represent an interesting target to potentiate this vascular effect, we previously described the conjugation of a photosensitizer to a peptide targeting neuropilins (NRPs) over-expressed specially in tumor angiogenic vessels and we recently characterized the mechanism of photosensitization-induced thrombotic events. Nevertheless, in glioma-bearing nude mice, we demonstrated that the peptide moiety was degraded to various rates according to time after intravenous administration. In this study, new peptidase-resistant pseudo-peptides were tested, demonstrating a molecular affinity for NRP-1 and NRP-2 recombinant chimeric proteins and devoid of affinity for VEGF receptor type 1 (Flt-1). To argue the involvement of NRP-1, MDA-MB-231 breast cancer cells were used, strongly over-expressing NRP-1 receptor. We evidenced a statistically significant decrease of the different peptides-conjugated photosensitizers uptake after RNA interference-mediated silencing of NRP-1. Peptides-conjugated photosensitizers allowed a selective accumulation into cells. In mice, no degradation was observed in plasma *in vivo* 4 h after intravenous injection by MALDI-TOF mass spectrometry. This study draws attention to this potential problem with peptides, especially in the case of targeting strategies, and provides useful information for the future design of more stable molecules.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Abbreviations: AcOH, acetic acid; Ahx, 6-aminohexanoic acid; a.u., arbitrary units; a.i., arbitrary intensity; CHAPS, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate; DCC, dicyclohexylcarbodiimide; DIEA, *N,N*-diisopropylethylamine; a.i., arbitrary intensity; DMF, dimethylformamide; DLI, drug-light interval; EDTA, ethylene diamine tetra acetic acid; FBS, fetal bovine serum; Flt-1, fms-like tyrosine kinase 1; Fmoc, 9-fluorenyl-methoxy-carbonyl; HOBt, 1-hydroxybenzotriazole; HPLC, high performance liquid chromatography; HUVEC, human umbilical vein endothelial cells; i.v., intravenous; MALDI-TOF, matrix assisted laser desorption ionisation-time-of-flight; NaBH₃CN, sodium cyanoborohydride; NHS, *N*-hydroxysuccinimide; NRP, neuropilin; NRP-1, neuropilin-1; NRP-2, neuropilin-2; PDT, photodynamic therapy; PEG, polyethylene glycol; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; RER, relative expression ratio; RNAi, RNA interference; RP-HPLC, reverse phase-high performance liquid chromatography; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; s.d., standard deviation; siRNA, small interfering RNA; tBu, tertio-butyl; TBTU, 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium tetrafluoroborate; TFA, trifluoroacetic acid; TIS, triethylsilane; TLC, thin layer chromatography; TPC, 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin; VEGF, vascular endothelial growth factor; Wt, wild type.

* Corresponding author at: Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne, Brabois, F-54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Tel.: +33 3 83 59 83 76.

E-mail address: m.barberi@nancy.fnclcc.fr (M. Barberi-Heyob).

1. Introduction

The selectivity of photodynamic therapy (PDT) as an anti-cancer treatment relies on the local generation of cytotoxic reactive oxygen species in the tumor tissue, due to both preferential uptake of the photosensitizer by malignant tissue and subsequent localized light irradiation. Indeed, the photosensitizer, at the concentrations used for PDT, is non-toxic in the dark and becomes photocytotoxic only when light at an appropriate wavelength is applied. However, the tumor tissue selectivity remains limited, as photosensitizers also tend to accumulate in normal tissue. This selectivity can be improved by using third generation photosensitizers, which consist of photosensitizers to which a tumor-targeting moiety is attached [1]. Among the tumor-targeting molecules, peptides are receiving increasing interest in the field of PDT. Indeed, the effective tissue penetration of short synthetic peptides, in combination with their selective binding and internalizing capacity by cancer cells, make peptides ideal candidates for the delivery of therapeutic agents such as photosensitizers [2].

Destruction of the neovasculature of tumors by PDT is thought to play a major part in the destruction of some vascularized tumors [3–5]. In order to potentiate the vascular effect of PDT, receptors specifically located on angiogenic endothelial cells, such as receptors to vascular endothelial growth factor (VEGF), can be used as molecular targets. We have previously described the conjugation of a photosensitizer (5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin, TPC), via a spacer (6-aminohexanoic acid, Ahx), to a heptapeptide (ATWLPPR), specific for the VEGF receptor neuropilin-1 (NRP-1), and reported the *in vitro* and *in vivo* efficacy of this new peptide-conjugated photosensitizer (referred to hereafter as TPC-Ahx-ATWLPPR) [6,7].

Despite their advantages as targeting agents, the main disadvantage of peptides is related to their structural conformation which makes them extremely sensitive to peptidases [8]. They often display low stability in biological fluids, which limits their use *in vivo*. Photosensitizer moiety of TPC-Ahx-ATWLPPR is responsible for the photocytotoxic activity of the conjugate, while the peptidic part is responsible for its selectivity. Degradation of the peptidic moiety of the conjugate would impair its selectivity, and would both allow it to accumulate in normal tissues, where the activated photosensitizer could exert non-desirable photocytotoxicity, and decrease the amount of photosensitizer delivered to targeted tumor tissues. We previously examined the *in vivo* stability of TPC-Ahx-ATWLPPR by high performance liquid chromatography (HPLC) and matrix assisted laser desorption ionisation-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. TPC-Ahx-ATWLPPR was stable *in vitro* in plasma but, following intravenous injection (i.v.) in nude mice, was degraded to various rates and TPC-Ahx-A was identified as the main metabolic product [9,10]. The use of peptidases-resistant pseudopeptides would increase further its stability *in vivo* without loss of affinity [11–13]. We identified the major site of degradation between A and T amino acids, leading us to suggest the synthesis of two modified peptides (aTWLPPR where a is (R)Ala, A ψ [CH₂NH]TWLPPR, where the amide bond between A and T residues is replaced by a –CH₂NH– bond, Fig. 1A). In the current study, we validate the chemical identity and the photophysical characteristics of these new conjugates and propose to demonstrate by competitive binding experiments that these pseudopeptides and conjugates describe an affinity for NRPs. Taking advantage of RNA silencing techniques known as RNA interference (RNAi), we have selectively silenced NRP-1 expression in MDA-MB-231 breast cancer cells to provide the evidence for the involvement of NRP-1 expression in conjugated photosensitizer cellular uptake. We also studied *in vivo* stability of the conjugated pseudopeptides by MALDI-TOF mass spectrometry.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of ATWLPPR, aTWLPPR and A ψ [CH₂NH]TWLPPR and purification

Unless otherwise stated, reagents were purchased from chemical companies and used without prior purification. Reagent grade solvents were used as received. 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin (TPC) was purchased from Porphyrin Systems (Lübeck, Germany). Fmoc-Arg(Pbf)-Wang, Fmoc-aminoacids, and Fmoc-aminohexanoic acid were from Senn Chemicals International (Dielsdorf, Switzerland) or Merck Novabiochem (Laüfelfingen Switzerland). Thin-layer chromatography (TLC) was carried out on Merck silica gel 60 F254 plates (Merck Chimie S.A.S., Fontenay Sous Bois, France) and developed with the appropriate solvents. The TLC spots were visualized either by UV light or by heating plates sprayed with a solution of phosphomolybdic acid (5% ethanolic solution). Chromatography column was carried out on Merck silica gel (40–63 μ m; 230–400

mesh ASTM). ATWLPPR, aTWLPPR and A ψ [CH₂NH]TWLPPR were synthesized on a multichannel peptide synthesizer [14], or a fully automated ResPepXL synthesizer (INTAVIS AG, Köln, Germany) according to a classical Fmoc/tBu solid-phase methodology. The side chains of arginine, tryptophan, and threonine were respectively protected by Pbf, Boc and tBu groups. The linker was introduced like an amino acid with Fmoc-Ahx-OH. Double coupling was performed using a 3-fold excess of *N*-Fmoc-amino acid (except during the photosensitizer coupling stage: 2-fold excess and single coupling) and activation reagents 2-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium tetrafluoroborate (TBTU) (3 equiv.), 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) (3 equiv.) and *N,N*-diisopropylethylamine (DIEA) (9 equiv.) in dimethylformamide (DMF). The reduced peptide was synthesized by condensation of 3 equiv. Fmoc-Leu-H, previously described in [15] on the *N*-terminus of growing peptide in DMF in the presence of 3 equiv. NaBH₃CN and some drops of AcOH overnight. The cleavage was realized by a 2 h treatment with TFA/H₂O/TIS (92.5:2.5:5) mixture. Peptides were purified by reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) on a C18 preparative column (150 \times 21.2 mm, Pursuit Varian) using a 0.1% (v/v) TFA-water/acetonitrile gradient, monitored by absorbance at 280 nm on a SPD-10A UV-visible detector (Shimadzu, France). Both compounds were lyophilized and kept in aliquots at –20 °C.

2.2. Synthesis of peptides-conjugated chlorin-type photosensitizer and purification

TPC was coupled to the *N*-terminus of the Ahx on the resin via its NHS ester. TPC-NHS was prepared in the dark under a nitrogen atmosphere by action of *N*-hydroxysuccinimide (1 equiv.) and dicyclohexylcarbodiimide (DCC) (1 equiv.) on TPC (1 equiv.) in CH₂Cl₂ for 4 h at room temperature. The solvent was evaporated and the crude material was purified by column chromatography using EtOH/CH₂Cl₂: 4/96 (v/v) as the eluent. The fractions were tested by TLC and the pure compound was isolated as a purple solid (73%). During the photosensitizer coupling stage, light exposure was minimized by sealing the reaction vessel in aluminum foil to limit the occurrence of unwanted side reactions. A standard cleavage with trifluoroacetic acid (TFA) and scavengers afforded the crude peptides-conjugated photosensitizers. Purification was made by reverse phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) on a C18 semi-preparative column (250 \times 10 mm I.D., Apollo, Alltech, Lokeren, Belgium) using a 0.1% (v/v) TFA-water/methanol gradient, monitored by absorbance at 280 nm on a SPD-10A UV-visible detector (Shimadzu, France). Both compounds were lyophilized and kept in the dark in aliquots at –20 °C.

2.3. Chemical characterization. MALDI-TOF mass spectrometry analysis

Five microliters of a 2,5-dihydroxybenzoic acid solution (150 mg/ml in water/acetonitrile, 1:1, v/v) was mixed with 1 μ l of sample and spotted on the stainless steel MALDI targets. The solvent was evaporated before insertion in the source. Analyses were performed on a Bruker Reflex IV time-of-flight mass spectrometer (Bruker-Daltonic, Bremen, Germany) equipped with the SCOUT 384 probe ion source. The system used a pulsed nitrogen laser (337 nm, model VSL-337ND, Laser Science Inc., Boston, MA) with a maximal energy of 400 μ J/pulse. Positive ion spectra were acquired with an acceleration voltage of 20 kV and reflector voltage of 23 kV in the 0–2000 Da *m/z* range. The detector signals were amplified and transferred to the Flex Control software 3.0 (Bruker-Daltonic). Spectra were processed with the Flex Analysis software 3.0 (Bruker-Daltonic). External calibration of

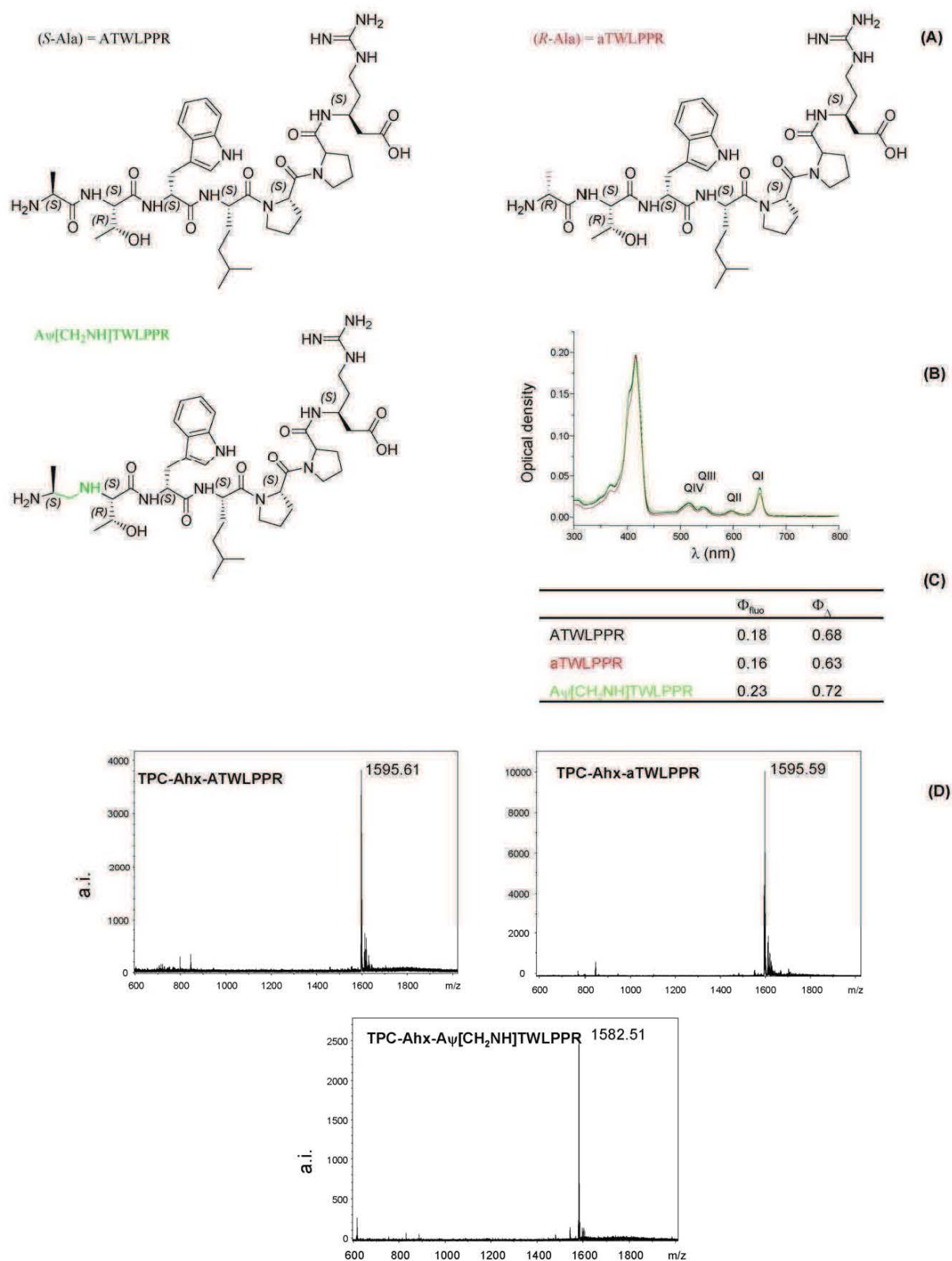


Fig. 1. Chemical structures of the peptides and photophysical characteristics of the conjugates. Chemical structures of the heptapeptide (ATWLPPR) and new pseudopeptides (aTWLPPR and Aψ[CH₂NH]TWLPPR) (A). Absorption spectra of TPC-Ahx-ATWLPPR (black), TPC-Ahx-aTWLPPR (red) and TPC-Ahx-Aψ[CH₂NH]TWLPPR (green) in ethanol (B). Fluorescence quantum yields (Φ_{fluo}) and singlet oxygen quantum yields (Φ_{Δ}) of these three peptides-conjugated photosensitizers (C). MALDI-TOF MS spectrum of TPC-Ahx-ATWLPPR, TPC-Ahx-aTWLPPR and TPC-Ahx-Aψ[CH₂NH]TWLPPR (D). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of the article.)

MALDI mass spectra was carried out using sodic and potassic distribution of PEG 600 and PEG 1500 mixtures.

2.4. Photophysical properties

Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer UV-visible spectrophotometer (Lambda 2, Courtaboeuf, France). Fluorescence spectra were recorded on a SPEX Fluorolog-3 spectrofluorimeter (Jobin Yvon, Longjumeau, France), equipped with a thermostated cell compartment (25 °C), using a 450 W Xenon lamp. The fluorescence quantum yields (Φ_f) in ethanol and quantum yields of singlet oxygen production ($\Phi(^1O_2)$) were determined as described previously [16].

2.5. Binding of peptides and peptides-conjugated TPC to recombinant NRP-1, NRP-2 and Flt-1 proteins

NRP-1, NRP-2 and Flt-1 were obtained from R&D Systems (Lille, France), as recombinant chimeric proteins. The surface of Maxisorp microplates (Dutscher) was coated with either NRP-1 (2 µg/mL), NRP-2 (5 µg/mL) or Flt-1 (2 µg/mL) in PBS, overnight at room temperature. The plates were blocked with PBS containing 0.5% bovine serum albumin (blocking buffer) during 1 h at 37 °C, to prevent non-specific interactions. Binding of the photosensitizer to NRP-1 was assessed using 5 ng/mL of biotinylated VEGF₁₆₅ (R&D Systems) in blocking buffer containing 2 µg/mL heparin. Biotinylated VEGF₁₆₅ was added to the coated wells, in competition, or not, with an excess of peptides-conjugated TPC or TPC or unlabelled VEGF₁₆₅ (R&D Systems), as a positive control. In the case of photosensitizers, 0.5% Tween-20 was added to the blocking buffer in order to allow for its solubilization. After a 2-h incubation at room temperature, the plates were washed and the amount of bound biotinylated VEGF₁₆₅ stained with streptavidin horseradish peroxidase conjugate (R&D Systems) and assayed. After 20 min at room temperature, reaction was stopped by the addition of Stop Solution (R&D Systems). Optical densities were measured at 450 nm. Results were expressed as relative absorbance to wells containing only blocking buffer. Three wells per condition were used.

2.6. Cell lines and culture

For *in vitro* experiments, MDA-MB-231 human breast cancer cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were maintained in minimum essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotic/antimitotic solution. They were cultured in 75 cm² flasks and incubated in 5% CO₂/95% humidified air at 37 °C. Cell culture materials were purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France). All other chemicals were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France), unless otherwise stated.

2.7. NRP-1-siRNA vector and stable transfection

RNA silencing technique known as RNA interference (RNAi) was used. Small interfering RNA (siRNA) oligonucleotides were obtained from Eurogentec in a purified and annealed duplex form. The sequences targeting the human NRP-1 gene are: 5'-GAGAGGTCTGAATGTTCC-3' (sense) and 5'-GGAACATTCAG-GACCTCTCC-3' (antisense). Scrambled siRNA with the following sequence: 5'-UAAAACUUCAGCCCAGUGA-3' (sense) and 5'-CAGUAAACGCCGUCUUAUA-3' (antisense) was used as the control. SiRNA transfection experiments were carried out using jetSi-ENDO transfection reagent with 100 nM siRNA, according to the manufacturer's instructions (Eurogentec). Double strand DNA oligonucleotide encoding the effective siRNA in the knockdown of

NRP-1 was synthesized with a loop sequence TTCAAGAGA and a RNA pol III terminator sequence consisting of a 6 poly T. This double strand DNA oligonucleotide was cloned into the RNAi-ready pSIREN vector (BD Biosciences Clontech) between the BamHI and EcoRI restriction sites with the U6 promoter. This vector contains a puromycin resistance gene for the selection of stable transfectants. A unique XbaI restriction site was placed downstream of the terminator sequence for restriction digest analysis to confirm the presence of the cloned insert. Four micrograms of pSIREN/U6/NRP-1-siRNA vector, or pSIREN/U6/scrambled-siRNA vector or pSIREN/U6 empty vector were used for stable transfection of MDA-MB-231 cells with TransPEI transfection reagent, according to the manufacturer's instructions (Eurogentec). The MDA-MB-231 clones were selected with 0.5 µg/mL of puromycin for 3 weeks. Single colonies were isolated and then screened for levels of the expression of NRP-1 protein by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot analyses. Five days before the experiments, the cells were placed into complete medium without puromycin supplement.

2.8. Proteins extraction and immunoblotting

Cells (MDA-MB-231 clones) were collected by scraping, washed with ice-cold phosphate buffered saline (PBS) and treated with lysis buffer, containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), 2 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) and 1 mM phenyl-methylsulphonyl fluoride (PMSF) for 30 min on ice, and further centrifuged at 15,000 × g for 20 min at 4 °C. Total protein concentration was determined using the DC Protein Assay (Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France), according to the manufacturer's instructions. Protein samples (25 µg) were heated to 95 °C for 7 min in the presence of 5% 2-mercaptoethanol, chilled on ice and separated on a 7.5% denaturing polyacrylamide gel, followed by electrophoretic transfer to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked with 5% (w/v) non-fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.1% (v/v) Tween-20 (TBST), overnight at 4 °C. Membranes were then incubated for 1 h with polyclonal anti-NRP-1 (sc-7239, Santa Cruz Biotechnology, Tebu, Le Perray en Yvelines, France), diluted 1: 200 in 5% (w/v) non-fat dry milk in TBST. After several washes, the blots were incubated with secondary anti-goat antibody linked to horseradish peroxidase (Donkey Anti-goat IgG,-HRP sc-2020, Santa Cruz, 1:2000). Bound antibody was detected using the ECL detection system (Amersham Biosciences, Orsay, France) and visualized by autoradiography. To ensure equal loading of proteins, blots were subsequently stripped and probed with a polyclonal anti-tubulin (sc-9104, Santa Cruz Biotechnology), using the procedure described above.

2.9. RNA isolation and RT-PCR analysis

Isolation of total RNA was performed using TRIzol Reagent (Invitrogen). cDNA synthesis was performed with 1 µg of total RNA in a reaction volume of 20 µL containing 4 µL of BioRad reaction mixture 5× and 1 µL of BioRad Iscript reverse transcriptase (Iscrip cDNA synthesis kit BioRad) and incubated 5 min at 25 °C, 30 min at 45 °C and 5 min at 75 °C in a thermocycler eppendorf. Each sample was then stored at -20 °C.

PCR reaction were performed with 2 µL of the reaction cDNA mixture in a volume of 20 µL containing 50 µM of each 5'- and 3'-primers, 1.6 µL dNTP 2.5 mM (Kit In vitrogen dNTP Set), 2 µL Buffer 10×, 0.6 µL MgCl₂ 50 mM and finally 0.2 µL of Taq DNA polymerase (Kit In vitrogen TaqDNA pol). The primer sequences were as follows: NRP-1, 5'-ATGGAGAGGGGCTGCCG-3' (sense), 5'-CTA TCG CGC TGT CGG TGT A-3' (antisense) [6]; GAPDH, 5'-TGGGGAAGGT-GAAGTCCGA-3' (sense) and 5'-GGATCTCGTCTGGAAGA-3' (an-

tisense) [17]. Tubes were incubated for amplification for 15 min at 95 °C, 1 min at 55 °C and 1 min at 72 °C for cycle 1 (Thermocycler Eppendorf). For Cycle 2-29: 30 s at 95 °C, 1 min at 55 °C and 1 min at 72 °C. For cycle 30: 30 s at 95 °C, 1 min at 55 °C and 10 min at 72 °C. GAPDH and NRP-1 products were analyzed using 1% agarose gel electrophoresis with 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ethidium bromide. Quantifications were performed by UV transillumination using Gel Doc EQ (BioRad).

2.10. Photosensitizers cellular uptake and selectivity

Cells were seeded in 96 wells plate (2×10^4 cells/well). Two plates per cell line were prepared. After 3 days, medium containing TPC or peptides-conjugated photosensitizers (5 μM) was added for different times, ranging from 2 to 24 h. We previously evaluated the *in vitro* dark cytotoxicity of TPC and TPC-Ahx-ATWLPPR for concentrations ranging from 0.05 to 50 μM and demonstrated that in the absence of light exposure with either photoactive compound yielded a surviving cell fraction higher than 85% for concentrations up to 5.00 μM [7]. Two plates per cell line were used, the first one to evaluate cellular viability using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, the second plate for intracellular incorporation. For photosensitizers cellular uptake, the plate was centrifuged ($1200 \times g$; 5 min), medium was then removed and cells were re-suspended in ethanol. Photosensitizers were extracted by a 10 min-sonication (Branson 1200, Roucaire Instruments Scientifiques, Les Ulis, France). Cell debris were removed by centrifugation ($3500 \times g$; 15 min). Fluorescence (recorded at 652 nm following excitation at 415 nm) was measured on a flx-Xenius spectrofluorimeter (SAFAS, Monaco).

The intracellular uptake of TPC and peptides-conjugated TPC by MDA-MB-231 was visualized by fluorescence microscopy. Briefly, cells were cultured in Slideflasks (Nunc, PolyLabo, Strasbourg, France) during 3 days, followed by incubation with TPC or the different peptide-conjugated TPCs (5 μM) during 3 h. After washing, fluorescence microscopy was performed with an upright epifluorescence microscope (AX70 Provis, Olympus, Rungis, France), equipped with a 100 W mercury vapor lamp, using a filter set consisting of a 400–440 nm band pass excitation filter, associated with a 570 nm dichroic mirror and a 590-nm-long pass filter. Neutral density filters were used in order to reduce photobleaching phenomenon. Fluorescence images were recorded using a $\times 40$ objective during a strictly controlled integration time. The same conditions (light intensity, objective, and integration time) were used for all photosensitizers, to allow comparison.

2.11. Preparation of samples for MALDI-TOF mass spectrometry analyses

Stock solutions in dimethylsulfoxide (2 mM) were used. The photosensitizers were diluted in polyethylene glycol (PEG) 400/ethanol/water (30:20:50, v/v/v) to the concentration required for intravenous (i.v) injection to mice (200 $\mu\text{L}/25$ g body weight). Female athymic Foxn1 nude mice (*nu/nu*) were used for this study (Harlan, Gannat, France). Animal care and studies were performed according to the European convention for the protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, EU directives and The Law on Statute on Animal Experiments in France. Mice (6–7/cage) were maintained in standard cages in isolators. Animals were housed with 12-h light/dark cycle at 22–24 °C and 50% humidity, and they were administered with food and water *ad libitum*. They were anesthetized using an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (Ketalar[®], Panpharma, Fougères, France) and xylazine (Rompun[®], Bayer Pharma, Puteaux, France) at a dose of 60 mg/kg and 8 mg/kg, respectively. Extraction of the conjugates from

plasma was carried out as previously described [10]. The procedure involved solvent precipitation using methanol combined with dimethyl sulfoxide (5/0.1, v/v). Using the response surface methodology, an optimal PDT condition was previously selected to model effects and interactions of photosensitizer dose and light dose in nude mice [6]. In order to explore the stability of the conjugates, we used the optimized photosensitizer dose 2.80 mg/kg (1.75 $\mu\text{mol}/\text{kg}$) for each conjugated photosensitizer injected to the mice via the tail vein.

2.12. Statistical analysis

Unless otherwise indicated, all the data are mean values \pm s.d. calculated from at least three independent experiments. Mann-Whitney *U* test was used to test for the significant level between independent variables. The level of significance was set to $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Chemical structure and photophysical characteristics

ATWLPPR, aTWLPPR and A ψ [CH₂NH]TWLPPR and the corresponding conjugated photosensitizers TPC-Ahx-ATWLPPR, TPC-Ahx-aTWLPPR and TPC-Ahx-A ψ [CH₂NH]TWLPPR were obtained with a final purity greater than 95%, as assessed by analytical RP-HPLC. In the case of conjugates, two isomers, corresponding to the reduction of a double bond on either opposing side of the tetrapyrrolic macrocycle could be observed by analytical RP-HPLC. These isomers arise from the asymmetrical character of the molecule. In our study, coupling using solid phase synthesis allowed site-specific conjugation of the chlorin to the amino-terminus of the peptides in a one to one ratio. This site of attachment on the peptides was chosen for simplicity reasons during synthesis and, more importantly, because the arginine at the carboxy-terminus of the peptide has been shown to be essential for activity [18]. A linker (Ahx) was used to attach the peptide to the photosensitizer, in order to ensure relative individualization of the two moieties of the molecule, and thus to preserve the attractive photophysical characteristics of the photosensitizer TPC and the specificity of peptides for receptors. Identities of TPC-Ahx-ATWLPPR, TPC-Ahx-aTWLPPR and TPC-Ahx-A ψ [CH₂NH]TWLPPR were confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry (Fig. 1). The absorption spectra of the conjugates were typical of chlorin derivatives, with the Q₁ band having the highest molar extinction coefficient among the four Q bands. Conjugation with the different peptides did not induce significant variations in fluorescence and singlet oxygen quantum yields compared to TPC (Fig. 1).

3.2. Molecular affinity of peptides and conjugated photosensitizers

The molecular affinities of the different compounds for NRP-1, NRP-2 and Flt-1 have been estimated using binding tests. As VEGF₁₆₅ binding to its receptors is heparin dependent, the competitive binding experiments were always carried out in the presence of heparin (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Peptides and conjugated photosensitizers bound to recombinant NRP-1 and NRP-2 chimeric proteins but were devoid of affinity for VEGF receptor type 1 (Flt-1) (Fig. 2A–C). Indeed, ATWLPPR, aTWLPPR and A ψ [CH₂NH]TWLPPR failed to displace the binding of biotinylated VEGF₁₆₅ to Flt-1 (Fig. 2C). Binding of biotinylated VEGF₁₆₅ to NRP-1 was displaced by ATWLPPR, aTWLPPR and A ψ [CH₂NH]TWLPPR in a concentration-dependent manner ($\text{IC}_{50} = 7, 8$ and $9 \mu\text{M}$, respectively) and in a comparable manner, binding to NRP-2 was also displaced by ATWLPPR, aTWLPPR and A ψ [CH₂NH]TWLPPR ($\text{IC}_{50} = 13, 13$ and $22 \mu\text{M}$, respectively) (Fig. 2D, left column). TPC-Ahx-ATWLPPR,

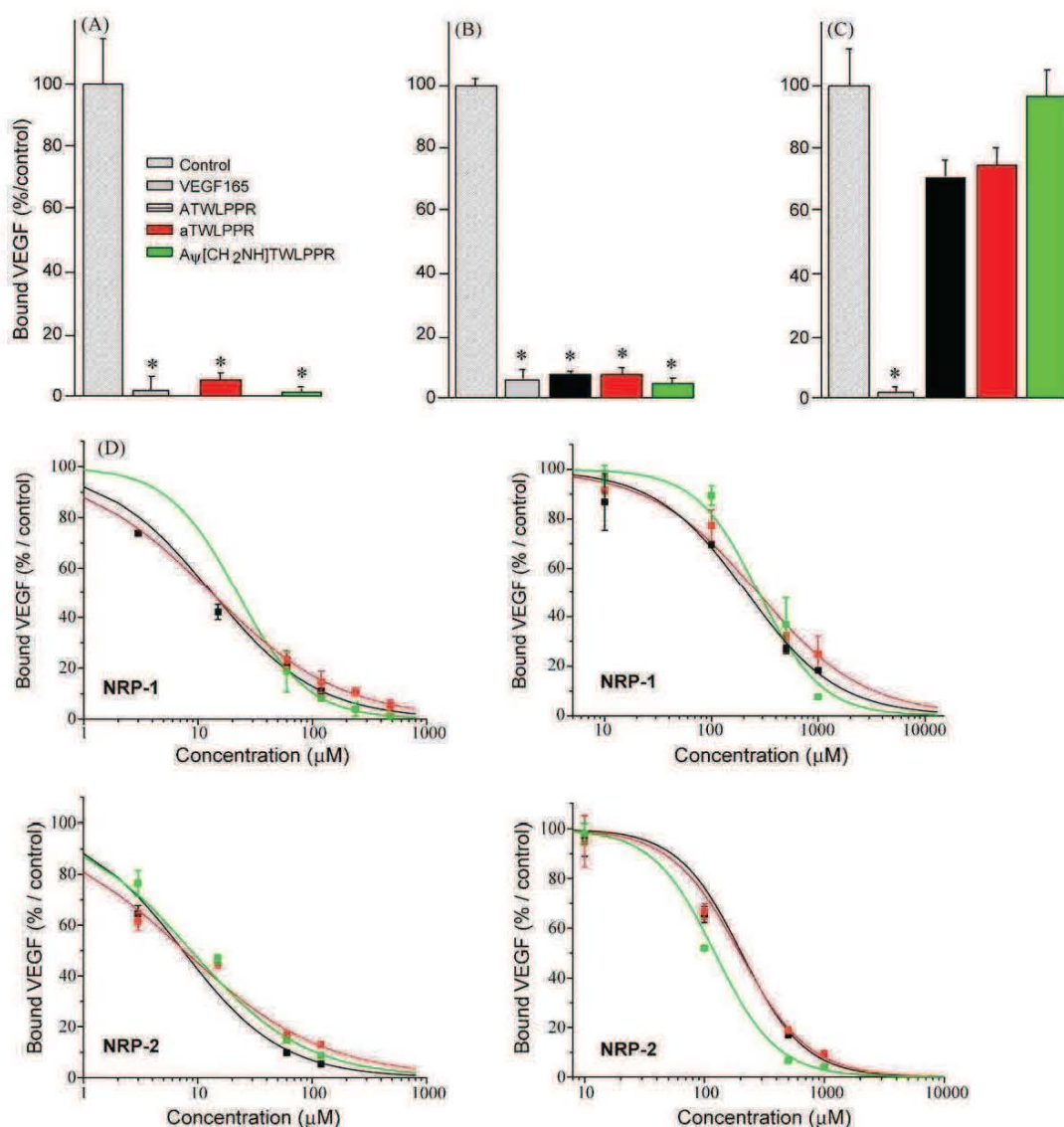


Fig. 2. Binding of peptides and peptides-conjugated TPC to recombinant NRP-1, NRP-2 and FIT-1 proteins (2, 5 and 2 µg/mL, respectively). Biotinylated VEGF₁₆₅ fixation on NRP-1 (A), NRP-2 (B) and FIT-1 (C), without (control) or with VEGF₁₆₅ (0.5, 1.0 and 0.5 µg/mL, respectively), or different peptides (480 µM). Data points show mean ± s.d., n = 3. *p < 0.05 vs. control. (D) Binding of biotinylated VEGF (5 ng/mL; 110 pM) to NRP-1 and NRP-2 in the presence of 2 µg/mL heparin was evaluated when increasing concentrations of competitors (data points show the mean ± s.d., n = 3). Binding of ATWLPPR, aTWLPPR and Aψ[CH₂NH]TWLPPR to NRP-1 and NRP-2 (left column) and corresponding conjugated photosensitizers TPC-Ahx-ATWLPPR, TPC-Ahx-aTWLPPR and TPC-Ahx-Aψ[CH₂NH]TWLPPR (right column).

TPC-Ahx-aTWLPPR and TPC-Ahx-Aψ[CH₂NH]TWLPPR showed affinity for NRP-1 (IC₅₀ = 213, 269 and 277 µM, respectively), and NRP-2 (IC₅₀ = 203, 197 and 122 µM, respectively) although to a lesser extent than non-conjugated peptides.

3.3. Intracellular uptake of TPC-Ahx-ATWLPPR, TPC-Ahx-aTWLPPR and TPC-Ahx-Aψ[CH₂NH]TWLPPR

For the conjugates TPC-Ahx-ATWLPPR, TPC-Ahx-aTWLPPR and TPC-Ahx-Aψ[CH₂NH]TWLPPR, the intracellular uptake was examined in the dark, at a non-cytotoxic concentration of 5.0 µM. TPC was used as a reference. Fig. 3A shows that the conjugates accumulated up to around 20 times more in NRP-1-expressing wild type MDA-MB-231 (Wt) cells than TPC. Because these enhanced accumulations of the conjugated photosensitizers, compared to TPC, could reflect intracellular uptake but also binding to the membrane without internalization, fluorescence microscopy experiments were undertaken to visualize intracellu-

lar uptake. The cells exhibited very intense and diffuse intracellular fluorescence following incubation with TPC-Ahx-ATWLPPR, TPC-Ahx-aTWLPPR and TPC-Ahx-Aψ[CH₂NH]TWLPPR, compared to TPC used at the same concentration (Fig. 3B). This fluorescence emission appeared mainly localized in the cytoplasmic compartment with no detectable nuclear staining.

3.4. NRP-1 knockdown and cellular selectivity

To precise the role of NRP-1 receptor in the cellular uptake of the conjugated photosensitizers, we applied RNA interference (RNAi) technology to knockdown the overexpression of NRP-1 protein in the Wt cells. siRNA, targeting a sequence of NRP-1 mRNA, was transfected into the Wt cells and the NRP-1 protein level was analyzed by immunoblotting. siRNA was able to decrease the protein expression of NRP-1 in knockdown MDA-MB-231 cells compared to the parent cells (Wt) and the stably transfected cells with a scrambled siRNA sequence (scrambled) which were used as

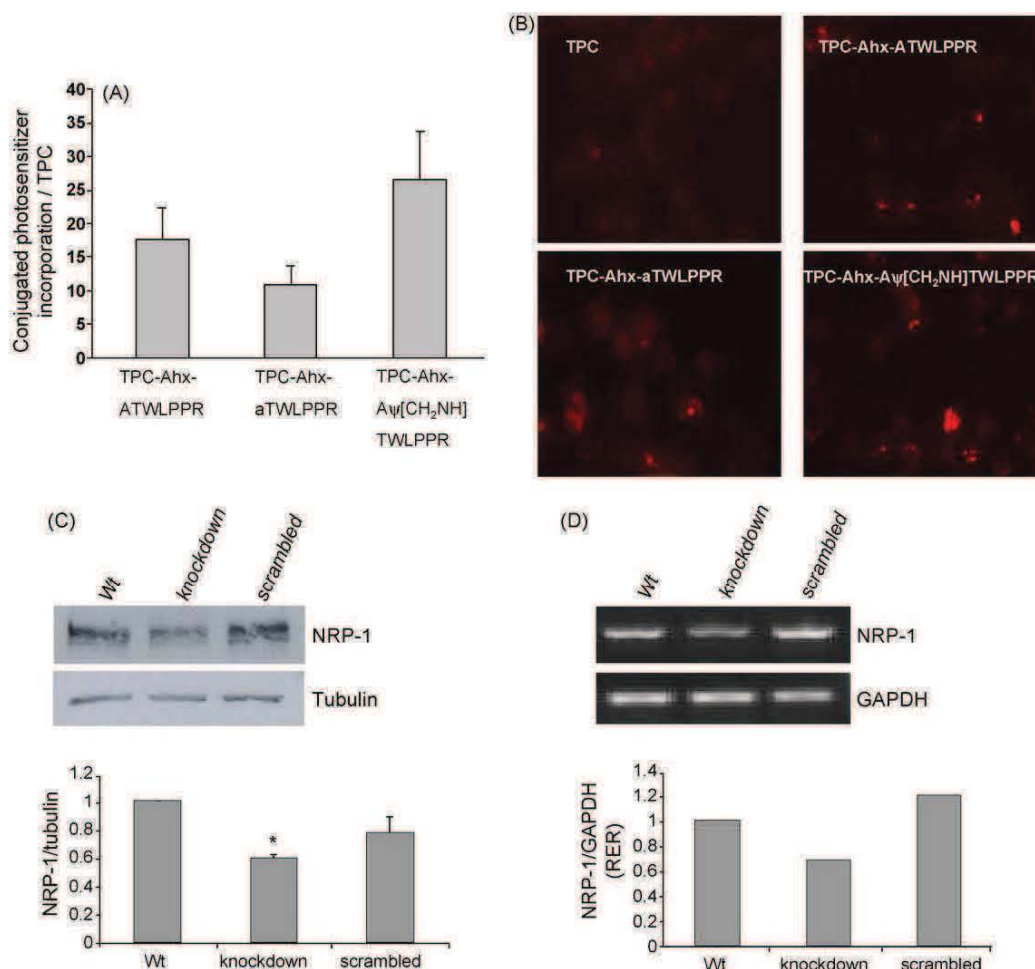


Fig. 3. Relative incorporation rate of peptides-conjugated TPC compared to TPC alone after contact with wild type MDA-MB-231 (Wt) cells for 24 h. The photosensitizer fluorescence intensity was normalized to cell viability. Cells were incubated in the presence of 5 μ M photosensitizers. Intracellular fluorescence intensity has been measured at 652 nm after excitation at 415 nm (A). Visualization of cellular uptake by fluorescence microscopy for Wt cells exposed for 3 h to TPC or peptide-conjugated TPC (B). Reduced expression of NRP-1 by siRNA in wild type MDA-MB-231 (Wt) cells, in MDA-MB-231 NRP-1 siRNA (knockdown) cells and in MDA-MB-231 transfected with a scrambled siRNA sequence, (scrambled) cells. Proteins were analyzed in the total protein extracted from cells by Western blot, using either a tubulin or NRP-1-specific polyclonal antibody. Results are representative of three independent experiments (C). Statistically significant difference between Wt and knockdown cells; * $P < 0.05$. Total RNA was extracted from cells, then subjected to semi-quantitative RT-PCR analysis. The relative levels of NRP-1 mRNA were normalized to those of GAPDH mRNA (D). Data from RT-PCR analysis are expressed as relative expression ratio (RER). Data points show the mean \pm s.d. of relative value normalized by report of the chlorin fluorescence, $n = 12$.

control (Fig. 3C). The selected clone exhibited approximately 1.6-fold lower NRP-1 protein expression than the control Wt. No significant difference was observed between MDA-MB-231 Wt cells and MDA-MB-231 cells transfected with the scrambled siRNA (Fig. 3C). The decrease in protein expression was also associated with a decrease in the level of mRNA in NRP-1 siRNA knockdown cells which display a 1.5-fold decrease in NRP-1 relative expression ratio (RER; Fig. 3D).

NRP-1 knockdown leads to decrease in TPC-Ahx-ATWLPPR, TPC-Ahx-aTWLPPR and TPC-Ahx-A ψ [CH₂NH]TWLPPR cellular uptakes (Fig. 4). A statistically significant decrease of different conjugated photosensitizers cellular uptakes after RNA interference-mediated silencing of NRP-1 was evidenced after 2 and 6 h of contact (Fig. 4). The three conjugates displayed a similar uptake rate which increased in function of time.

3.5. *In vivo* plasma stability

The *in vivo* stability of the peptides-conjugated photosensitizers has been estimated in nude mice plasma at 1 and 4 h post-injection, by mass spectrometry analyses. Four hours after

injection, we identified a predominant metabolic product as resulting from the enzymatic cleavage of the peptide bond between the alanyl and threonyl residues of TPC-Ahx-ATWLPPR and TPC-Ahx-aTWLPPR. This main degradation product (TPC-Ahx-A) was detected in plasma from 4 h post-injection. For TPC-Ahx-aTWLPPR, a second degradation site has been also identified into the pseudo-peptide moiety between threonine and tryptophan amino acids (Fig. 5). No degradation product of TPC-Ahx-A ψ [CH₂NH]TWLPPR could be observed *in vivo* in plasma up to 4 h after intravenous injection (Fig. 5).

4. Discussion

One of the main disadvantages of peptides is their high sensitivity to proteolysis which could limit their use *in vivo* [8]. In our strategy, peptides are selected as targeting moiety. Indeed, the photodynamic properties of the conjugated photosensitizers are brought by the photosensitizer moiety, while selectivity is due to the presence of the peptide. Thus, a degradation of the peptidic moiety is detrimental to selectivity. The ATWLPPR peptide has already been used in several *in vitro* and *in vivo* studies [19–22],

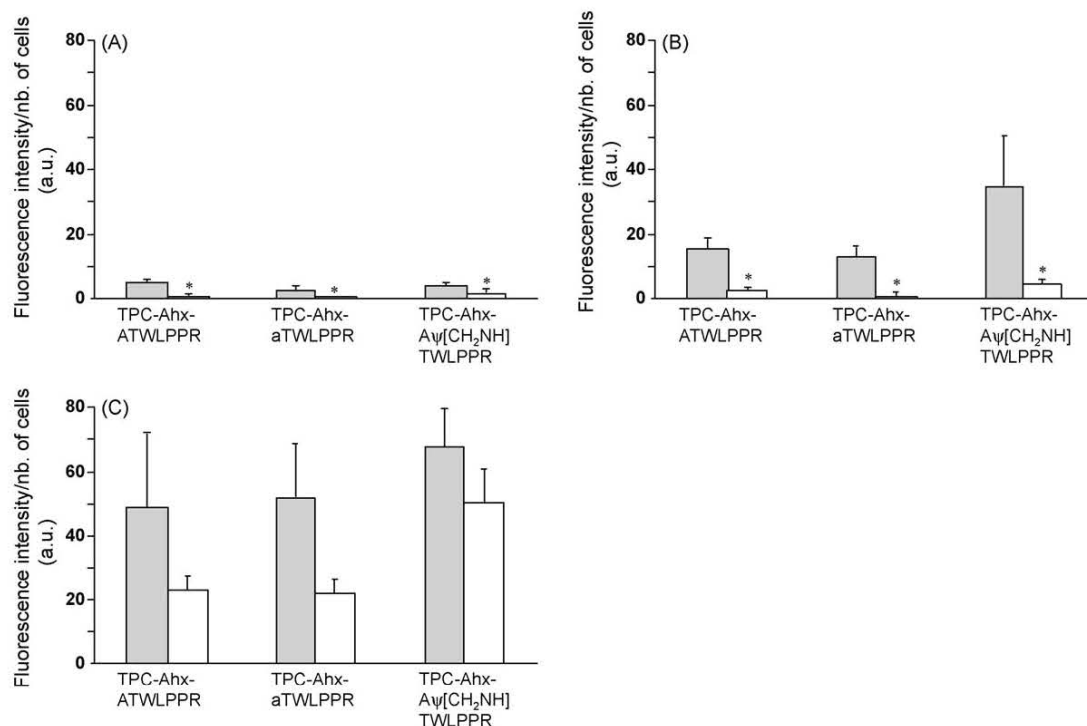


Fig. 4. Uptake of TPC-Ahx-ATWLPPR, TPC-Ahx-aTWLPPR and TPC-Ahx-Aψ[CH₂NH]TWLPPR in Wt cells (grey) compared to knockdown cells (white). Cells were incubated with photosensitizers at 5 μM for 2 h (A), 6 h (B) and 24 h (C). Cellular fluorescence intensities after extraction were measured at 652 nm following excitation at 415 nm and cell concentrations were deduced from a calibration curve by MTT test (data points show the mean ± s.d., n = 12). *P < 0.05, knockdown vs. Wt cells.

but, to the best of our knowledge, none had reported on its instability. We previously investigated the *in vivo* instability of TPC-Ahx-ATWLPPR following i.v. injection into mice; a significant degradation of the peptide was evidenced in plasma from 4 h post injection. This was not really surprising, a variety of proteases are present in human plasma, including both exopeptidases and endopeptidases [23,24]. We have also characterized the main metabolic product as being TPC-Ahx-A [10]. This metabolite has lost any selectivity for angiogenic endothelial cells since the arginyl residue at the C-terminus of the ATWLPPR peptide has been shown to be essential for affinity against NRP-1 [18]. In this study, we evidenced that selection of peptidases-resistant pseudopeptides can improve the peptide stability *in vivo* without loss of its affinity. This approach implied the generation of modified peptides with improved stability properties, through e.g. the use of D-amino acids and reduced peptide bonds [8].

For this aim, two optimized pseudopeptides (aTWLPPR and Aψ[CH₂NH]TWLPPR) were studied. We validated the chemical identities of the new conjugated photosensitizers by MALDI-TOF mass spectrometry. Their absorption spectra were typical of chlorin derivatives, and the conjugation with the different peptides (ATWLPPR, aTWLPPR or Aψ[CH₂NH]TWLPPR) did not induce significant variations in photophysical properties, fluorescence and singlet oxygen quantum yields.

Affinity for NRP-1 and NRP-2 decreased following coupling to chlorin. Indeed, TPC-Ahx-ATWLPPR, TPC-Ahx-aTWLPPR and TPC-Ahx-Aψ[CH₂NH]TWLPPR showed affinity for both NRPs but to a lesser extent than non-conjugated peptides. Reasons for this may include intramolecular interactions between TPC and peptides, and steric hindrance due to the TPC moiety. The linker was used as a spacer to couple the photoactivable compound to peptides, in order to individualize these two moieties. We previously demonstrated that the conjugation with Ahx alone did not

interfere with ATWLPPR binding on NRP-1 [7]. Nevertheless, the presence of a spacer brings flexibility to the molecule, and its length, as well as the nature of the molecule attached to it, may impact on receptor affinity [25,26]. We did not test the influence of varying spacer length on receptors affinity however in another approach, evaluating new peptides targeting NRP-1, some molecular affinity tests were performed with three different spacers (Ahx), polyethylene glycol (PEG)9 (1-amino-3,6-dioxo-octanoic acid), and PEG18 (1-amino-9-aza-3,6,12,15-tetraoxa-10-on-heptadecanoic acid) linked up TPC and new peptides (unpublished results). We evidenced that the spacer length and its nature did not influence the affinity results but led to an increase of solubility with the PEG moieties as linkers. In another previous work, folic acid was conjugated to 4-carboxyphenylporphyrin via two short linkers, that were different in nature but similar in size [27]. Both conjugated photosensitizers showed improved intracellular uptake in human oropharyngeal epidermoid carcinoma KB cells, compared to the unconjugated photosensitizer. ATWLPPR has also been shown to bind NRP-2 [21]. Interestingly, new pseudopeptides (aTWLPPR or Aψ[CH₂NH]TWLPPR) exhibited comparable affinities for NRP-1 or NRP-2 compared to the affinity of the reference peptide ATWLPPR.

We evidenced an increase of these conjugates cellular uptake (whatever the conjugated peptide ATWLPPR, aTWLPPR or Aψ[CH₂NH]TWLPPR) compared to chlorin alone and a statistically significant decrease of the conjugated photosensitizers uptake after RNA interference-mediated silencing of NRP-1. Indeed, taking advantage of RNA silencing techniques known as RNAi, we have selectively silenced NRP-1 expression in MDA-MB-231 breast cancer cells to provide the evidence for the involvement of NRP-1 expression in TPC-Ahx-ATWLPPR, TPC-Ahx-aTWLPPR and TPC-Ahx-Aψ[CH₂NH]TWLPPR cellular uptakes. The decrease in NRP-1 protein expression in knockdown MDA-MB-231 cells was associ-

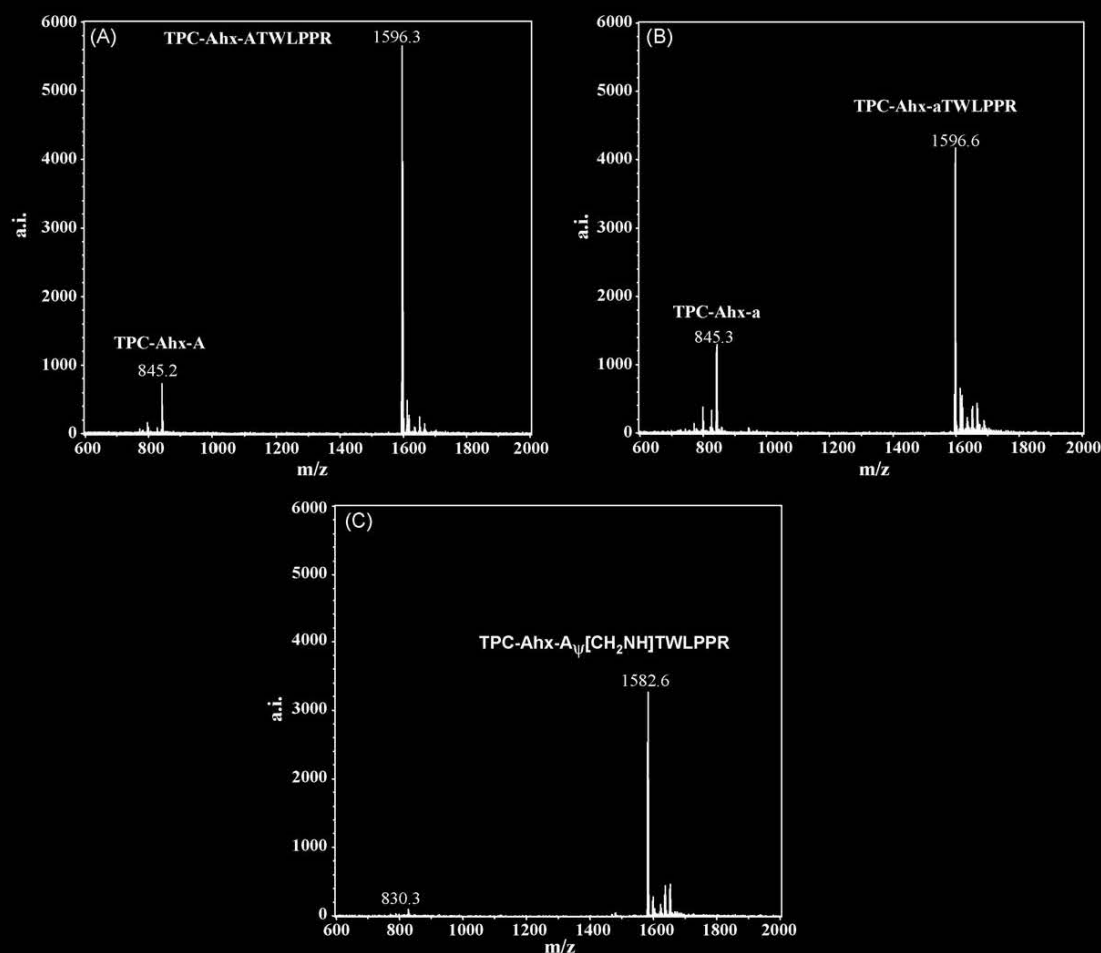


Fig. 5. MALDI-TOF mass spectrum of TPC-Ahx-ATWLPPR (A), TPC-Ahx-aTWLPPR (B) and TPC-Ahx-A ψ [CH₂NH]TWLPPR (C) in nude mice plasma 4 hours after i.v. injection (5.6 mg/mL; 3.5 μ mol/kg).

ated with a decrease in the level of transcript. The significant decrease of the conjugated photosensitizers uptake after RNAi-mediated silencing of NRP-1 confirms the involvement of NRP-1 in the conjugates cellular accumulation.

In order to explore the stability of TPC-Ahx-ATWLPPR, TPC-Ahx-aTWLPPR and TPC-Ahx-A ψ [CH₂NH]TWLPPR *in vivo*, conjugates stability were determined in plasma at different times following i.v. injection into mice. As observed for TPC-Ahx-ATWLPPR, the pseudopeptides-conjugated photosensitizers were stable in plasma for at least 1 hour. Whereas TPC-Ahx-ATWLPPR and TPC-Ahx-aTWLPPR were degraded 4 h post-injection, no degradation was observed in plasma for TPC-Ahx-A ψ [CH₂NH]TWLPPR. This result provides essential information for the choice of A ψ [CH₂NH]TWLPPR as an interesting candidate to improve the *in vivo* stability of conjugated photosensitizers.

The present study draws attention to this potential problem using peptides, especially in the case of targeting strategies and these promising results lead us to suggest for instance, the elaboration of multifunctional nanoparticles functionalized by these pseudopeptides for the photosensitizers delivery.

Acknowledgements

This work was supported by the research funds of the French Ligue Nationale Contre le Cancer and the ANR project no. ANR-08-PCVI-0021-01 "Nano-VTP".

References

- [1] Sharman WM, van Lier JE, Allen CM. Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2004;56:53–76.
- [2] Schneider R, Tirand L, Frochet C, Vanderesse R, Thomas N, Gravier J, et al. Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2006;6:469–88.
- [3] Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:889–905.
- [4] Folkman J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1995;1:27–31.
- [5] Ichikawa K, Hikita T, Maeda N, Yonezawa S, Takeuchi Y, Asai T, et al. Anti-angiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels. *Biochim Biophys Acta* 2005;1669:69–74.
- [6] Tirand L, Bastogne T, Bechet D, Linder M, Thomas N, Frochet C, et al. Response surface methodology: an extensive potential to optimize *in vivo* photodynamic therapy conditions. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2009;75:244–52.
- [7] Tirand L, Frochet C, Vanderesse R, Thomas N, Trinquet E, Pinel S, et al. A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release* 2006;111:153–64.
- [8] Adessi C, Soto C. Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Curr Med Chem* 2002;9:963–78.
- [9] Thomas N, Tirand L, Chatelut E, Plenat F, Frochet C, Dodeller M, et al. Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice. *Photochem Photobiol Sci* 2008;7:433–41.
- [10] Tirand L, Thomas N, Dodeller M, Dumas D, Frochet C, Maunier B, et al. Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: an *in vivo* and *in vitro* study. *Drug Metab Dispos* 2007;35:806–13.
- [11] Coy DH, Heinz-Erian P, Jiang NY, Sasaki Y, Taylor J, Moreau JP, et al. Probing peptide backbone function in bombesin. A reduced peptide bond analogue

- with potent and specific receptor antagonist activity. *J Biol Chem* 1988; 263:5056–60.
- [12] Martínez J, Bali JP, Rodriguez M, Castro B, Magous R, Laur J, et al. Synthesis and biological activities of some pseudo-peptide analogues of tetragastrin: the importance of the peptide backbone. *J Med Chem* 1985;28:1874–9.
- [13] Szelke M, Leckie B, Hallett A, Jones DM, Sueiras J, Atrash B, et al. Potent new inhibitors of human renin. *Nature* 1982;299:555–7.
- [14] Neimark J, Briand JP. Development of a fully automated multichannel peptide synthesizer with integrated TFA cleavage capability. *Pept Res* 1993;6:219–28.
- [15] Douat C, Heitz A, Martinez J, Fehrentz JA. Synthesis of N-protected alpha-amino aldehydes from their morpholine amide derivatives. *Tetrahedron Lett* 2000;41:37–40.
- [16] Di Stasio B, Frochet C, Dumas D, Even P, Zwier J, Muller A, et al. The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. *Eur J Med Chem* 2005.
- [17] Kattan Z, Marchal S, Brunner E, Ramacci C, Leroux A, Merlin JL, et al. Damaged DNA binding protein 2 plays a role in breast cancer cell growth. *PLoS One* 2008;3:e2002.
- [18] Starzec A, Ladam P, Vassy R, Badache S, Bouchemal N, Navaza A, et al. Structure-function analysis of the antiangiogenic ATWLPPR peptide inhibiting VEGF(165) binding to neuropilin-1 and molecular dynamics simulations of the ATWLPPR/neuropilin-1 complex. *Peptides* 2007;28:2397–402.
- [19] Janssen AP, Schiffelers RM, ten Hagen TL, Koning GA, Schraa AJ, Kok RJ, et al. Peptide-targeted PEG-liposomes in anti-angiogenic therapy. *Int J Pharm* 2003;254:55–8.
- [20] Rodrigues S, Van Aken E, Van Bocxlaer S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, et al. Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *FASEB J* 2003;17:7–16.
- [21] Perret GY, Starzec A, Hauet N, Vergote J, Le Pecheur M, Vassy R, et al. In vitro evaluation and biodistribution of a 99mTc-labeled anti-VEGF peptide targeting neuropilin-1. *Nucl Med Biol* 2004;31:575–81.
- [22] Renno RZ, Terada Y, Haddadin MJ, Michaud NA, Gragoudas ES, Miller JW. Selective photodynamic therapy by targeted verteporfin delivery to experimental choroidal neovascularization mediated by a homing peptide to vascular endothelial growth factor receptor-2. *Arch Ophthalmol* 2004;122:1002–11.
- [23] McDonald JK, Barrette AJ. *Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography*. 1. Endopeptidases. London: Academic Press; 1980.
- [24] McDonald JK, Barrette AJ. *Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography*. 2. Exopeptidases. London: Academic Press; 1986.
- [25] Kostenich G, Livnah N, Bonasera TA, Yechezkel T, Salitra Y, Litman P, et al. Targeting small-cell lung cancer with novel fluorescent analogs of somatostatin. *Lung Cancer* 2005;50:319–28.
- [26] Engel A, Chatterjee SK, Al-Arifi A, Nuhn P. Influence of spacer length on the agglutination of glycolipid-incorporated liposomes by ConA as model membrane. *J Pharm Sci* 2003;92:2229–35.
- [27] Schneider R, Schmitt F, Frochet C, Fort Y, Lourette N, Guillemin F, et al. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. *Bioorg Med Chem* 2005;13:2799–808.

VI. Synthèse générale et perspectives

La sélectivité en PDT repose sur le tropisme tumoral des photosensibilisateurs et l'irradiation limitée à la zone tumorale. Mais cette sélectivité demeure relative et parfois controversée. Le ciblage de cellules spécifiques par les photosensibilisateurs s'affiche comme un challenge essentiel pour l'essor de la PDT.

Pour assurer un ciblage sélectif des cellules, les photosensibilisateurs peuvent être couplés de manière covalente à des molécules d'adressage de différentes natures, en fonction de la cible moléculaire visée [1]. Deux stratégies de ciblage sont généralement décrites en PDT oncologique : le ciblage des cellules tumorales pour conduire à l'éradication directe des cellules néoplasiques constitutives du tissu tumoral et le ciblage vasculaire pour générer l'asphyxie tissulaire.

Notre stratégie de ciblage de la vascularisation en VTP repose sur la connaissance des marqueurs moléculaires surexprimés par les cellules endothéliales vasculaires présentes dans le tissu tumoral et leur adressage par le photosensibilisateur. NRP-1 est surexprimé par ces cellules et entre en compétition avec VEGFR-2 pour la liaison à VEGF-A₁₆₅, principal médiateur de l'angiogenèse tumorale [163]. Nos recherches sur l'efficacité de ciblage vasculaire en VTP ont confirmé l'intérêt thérapeutique du peptide ATWLPPR, affiné pour NRP-1 et ont montré une efficacité anti-tumorale améliorée du photosensibilisateur couplé au peptide par comparaison au photosensibilisateur non fonctionnalisé [54, 177, 180, 181]. En revanche, les études de stabilité *in vivo* ont montré une dégradation rapide de la portion peptidique dans les organes du SRE [181]. En effet, l'utilisation d'agents thérapeutiques peptidiques présente des limites du fait de leur dégradation possible par les peptidases de l'organisme, leur faible capacité à traverser les barrières physiologiques et leur manque de sélectivité pour leurs cibles [2].

De nombreuses équipes ont réfléchi à modifier la structure chimique des peptides sans altérer leur sélectivité moléculaire et ont ainsi développé des dérivés peptidiques biologiquement plus stables et conservant leur efficacité du point de vue thérapeutique [3, 182-184].

Dans le cadre de notre stratégie de ciblage de NRP-1, le peptide initial ATWLPPR a été « stabilisé » contre les attaques enzymatiques par la modification chimique de la liaison amide entre les résidus alanine et thréonine [3]. Les deux pseudopeptides ainsi formés (aTWLPPR et Aψ[CH₂NH]TWLPPR) ont été caractérisés et étudiés *in vitro*. L'affinité

moléculaire des pseudopeptides pour NRP-1 s'est révélée équivalente à celle du peptide initial. Cependant, leur couplage à la chlorine a réduit environ d'un facteur 10 leur affinité pour le récepteur. Les études *in vitro* sur les cellules humaines de cancer mammaire MDA-MB-231 surexprimant NRP-1 et les mêmes cellules réprimées pour NRP-1 ont confirmé la sélectivité cellulaire des nouveaux conjugués pour les cellules surexprimant NRP-1, et l'implication de NRP-1 dans leur incorporation cellulaire. Les études de stabilité *in vivo* n'ont validé qu'un seul des deux pseudopeptides, A ψ [CH₂NH]TWLPPR, comme étant résistant au clivage enzymatique.

Les pseudopeptides ont montré leur intérêt pour de multiples utilisations en thérapie et particulièrement pour l'adressage de photosensibilisateurs, vectorisés ou non, en PDT. D'autres peptides plus affins vis-à-vis de NRP-1 sont actuellement étudiés (Collaboration Régis Vandersse, thèse d'Ezatul Ezleen Kamarulzaman). Une méthode de modélisation moléculaire (*docking*) a permis le *design* de peptides sur la base des exons 7 et 8 du VEGF-A. Les peptides ont ensuite été synthétisés et sélectionnés par test ELISA (*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay*) avant d'être greffés à un photosensibilisateur pour évaluer leur stabilité *in vivo*.

Notre stratégie a permis d'améliorer la sélectivité vasculaire de la chlorine, mais l'utilisation de photosensibilisateurs hydrophobes reste un verrou en PDT. En effet, le caractère hydrophobe des molécules photo-activables utilisées en PDT induit leur agrégation et donc leur reconnaissance par le SRE. Dans le cadre de notre stratégie, le SRE a largement contribué à la dégradation enzymatique de la portion peptidique de notre molécule photo-activable [180]. Des améliorations ont été apportées par notre équipe de recherche pour réduire les phénomènes d'agrégation de la TPC. Des nanoparticules multifonctionnelles à caractère furtif et vectrices de la TPC ont été élaborées [108, 185]. Leur petite taille (5 à 20 nm) et leurs propriétés physiques originales font des nanoparticules des outils adaptés en PDT. La perspective de ce travail sur les pseudopeptides serait de les coupler aux nanoparticules, dans un ratio peptide/nanoparticule qui ne destabiliserait pas l'affinité des pseudopeptides pour NRP-1.

PARTIE III

Couplage de la cytotoxicité du ruthénium
avec la phototoxicité de la PDT

La deuxième partie de ma thèse a été consacrée au couplage de la cytotoxicité du ruthénium avec la phototoxicité de la PDT. Nous avons ainsi utilisé des complexes porphyrine-ruthénium et chlorine-ruthénium en PDT. Ces études ont été menées *in vivo*, par une méthodologie de plan d'expérience, sur un modèle de souris *nude* xéno greffées en ectopique avec des cellules de carcinome oral humain KB.

I. Agents alkylants à base de métal

L'ère des médicaments anti-tumoraux à base de métal a commencé avec la découverte en 1969 du cisplatine, complexe de platine II [Pt(II)], par Barnett Rosenberg [186] (**Figure 19**).

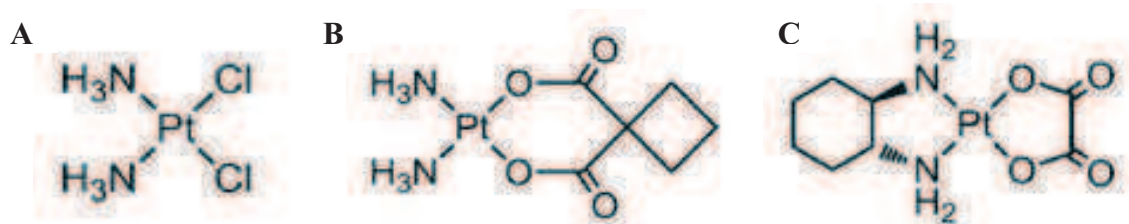


Figure 19 : Structure chimique des complexes de Pt(II) cisplatine (A), carboplatine (B), oxaliplatine (C).

Le mécanisme d'action anti-tumoral des complexes métalliques est basé sur leur capacité à engager un processus redox [187]. En effet, les molécules cytotoxiques à base de métal sont des substances à potentiel redox élevé qui interfèrent avec la balance redox intracellulaire, induisant ainsi la production d'ERO (**Figure 20**). Les cellules tumorales possèdent un milieu intracellulaire et extracellulaire réducteur, comparé à celui des cellules saines, résultant d'une activité métabolique élevée et donc d'un environnement hypoxique [20]. La stratégie cytotoxique anti-tumorale *via* les métaux tire profit des conditions réductrices des cellules tumorales en induisant l'interaction avec la balance redox et l'activation par réduction des complexes métalliques spécifiquement au niveau des cellules tumorales [187].

Les ERO causent alors des dommages cellulaires et moléculaires importants :

- coupure double brin de l'ADN ;
- capture de l'intégrité membranaire des mitochondries ;
- peroxydation lipidique conduisant à une perturbation membranaire ;
- oxydation des résidus cystéine induisant une modification de la structure secondaire des protéines.

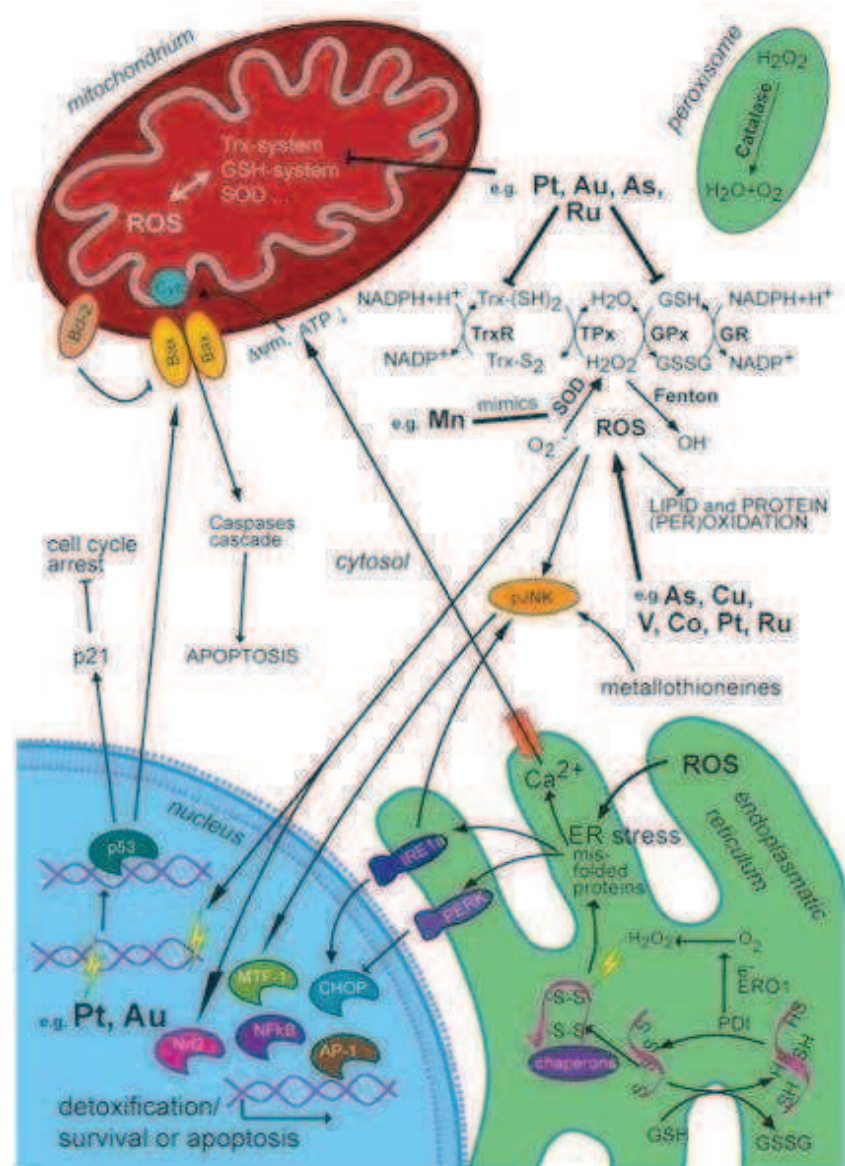


Figure 20 : Principaux mécanismes d'action des complexes métalliques anti-tumoraux et leurs interactions avec les voies du stress oxydatif et de la balance redox intracellulaire, d'après [187]. Les différents complexes métalliques ciblent différents sites cellulaires. Le platine (**Pt**) et l'or (**Au**) agissent principalement au niveau nucléaire, mitochondrial et cytoplasmique pour interagir avec la thioredoxine (**Trx**) et le glutathion (**GSH**). Le ruthénium (**Ru**) et l'arsenic (**As**) interagissent également avec ces deux protéines impliquées dans l'homéostasie redox cellulaire. Un dérèglement de cette balance conduit à la formation et à l'accumulation d'ERO (**ROS**) dans le cytoplasme. Les complexes à base de cobalt (**Co**), cuivre (**Cu**), vanadium (**V**), Ru, As et Pt produisent directement des ROS, augmentant le stress oxydatif dans le cytoplasme. L'accumulation de ROS dans le cytoplasme conduit à la peroxydation lipidique, à l'oxydation protéique et à l'activation de facteurs de transcription sensibles au stress tels que p53, Nrf-2, Nf-κB, AP-1 et CHOP qui provoquent l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire. De plus, les ROS agissent au niveau mitochondrial pour inhiber le potentiel membranaire et induire la libération de cytochrome c (**cyt c**), capable d'activer la voie des caspases. Au niveau du réticulum endoplasmique (**ER**), les ROS conduisent à la destruction des protéines. Le stress oxydatif du ER induit la libération de calcium (Ca^{2+}) qui augmente la perméabilité des pores membranaires mitochondriaux. **TPx** : thioredoxine peroxydase. **GPx** : glutathion peroxydase. **GR** : glutathion réductase. **SOD** : superoxyde dismutase.

De nombreux agents de chimiothérapie organiques s'inactivent dans l'environnement hypoxique des cellules tumorales [187]. Au contraire, les complexes métalliques s'activent et leur état réduit permet, en plus de la production d'ERO, leur interaction avec les biomolécules telles que le glutathion et l'acide ascorbique, l'ADN et les lipides membranaires des organites cellulaires [187].

Le cisplatine est un des agents de chimiothérapie les plus utilisés pour le traitement de nombreuses cibles tumorales [188]. Seul ou en association avec d'autres molécules ou modes de traitement, le cisplatine est utilisé pour le traitement du cancer des testicules, des ovaires, de la vessie, du col de l'utérus, de la tête et du cou et du poumon. Des analogues au cisplatine ont également été synthétisés et validés cliniquement : le carboplatine et l'oxaliplatine (**Figure 20**). Ces complexes présentent les mêmes mécanismes d'action que le cisplatine [189].

Cependant, ces complexes à base de Pt(II) induisent de nombreux effets secondaires dans l'organisme, tels qu'une néphrotoxicité, une ototoxicité et une neurotoxicité [190-192]. Nausées, vomissements et alopecies sont également largement observés chez les patients traités par cisplatine. De plus, l'efficacité thérapeutique du cisplatine est limitée par l'apparition d'une résistance au traitement [193].

Ces lourds inconvénients ont amené les chimistes et biologistes à synthétiser des complexes à base d'autres métaux que le cisplatine, induisant moins d'effets secondaires mais possédant les mêmes propriétés anti-tumorales. Ont ainsi été utilisés le ruthénium (Ru), l'or, l'arsenic, le cuivre, le vanadium, le rhodium, le cobalt, le manganèse, le gallium et le titane [194-197]. Certains de ces complexes présentent une meilleure activité anti-tumorale que le cisplatine, y compris sur les tumeurs qui y sont résistantes, et moins d'effets secondaires [190, 198].

1. Les complexes ruthénium-polypyridyl

Le ruthénium (Ru) est un cation bivalent dont la structure électronique lui permet de chélater 6 atomes. Les complexes ruthénium-polypyridyl possèdent des propriétés d'absorption très intéressantes pour la PDT, notamment la possibilité d'être excité en bi-photon. Les complexes ruthénium-polypyridyl absorbent fortement à 450 nm et émettent à 620 nm dans l'eau. Après l'absorption d'énergie photonique, on distingue 4 types de transitions électroniques entre les orbitales moléculaires des complexes ruthénium-polypyridyl (**Figure 21**) [199] :

- Les transitions *Ligand-Ligand* (LL). Elles correspondent à une transition électronique entre deux orbitales des ligands. Elles nécessitent l'apport d'un haut niveau d'énergie (irradiation dans l'UV).
- Les transitions *Metal Centered* (MC). Elles correspondent à une transition électronique entre deux orbitales du métal. Elles nécessitent l'apport d'énergie de bas niveau.
- Les transitions *Metal-to-Ligand Charge Transfer* (MLCT). Elles correspondent à une transition électronique d'une orbital du métal vers une orbitale du ligand. Elles nécessitent l'apport d'énergie de niveau moyen (irradiation dans le visible).
- Les transitions *Ligand-to-Metal Charge Transfer* (LMCT). Elles correspondent à une transition électronique d'une orbitale du ligand vers une orbitale du métal. Elles nécessitent également l'apport d'énergie de niveau moyen.

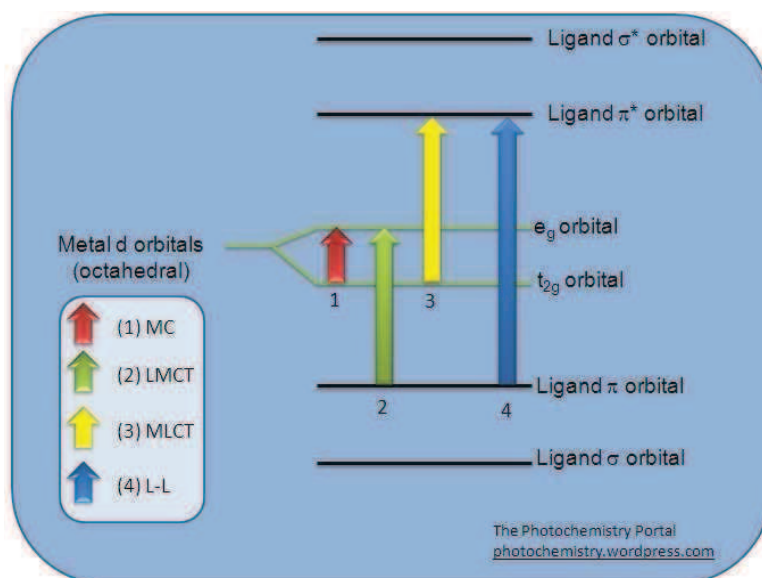


Figure 21 : Transitions électroniques au sein d'un complexe ruthénium-polypyridyl après excitation photonique, d'après [199]. MC : *Metal Centered*. LMCT : *Ligand-to-Metal Charge Transfer*. MLCT : *Metal-to-Ligand Charge Transfer*. L-L : *Ligand-Ligand transition*. Les flèches montantes traduisent le niveau d'énergie nécessaire pour la transition correspondante.

Ce phénomène de transition électronique résulte de la structure octaédrique des complexes ruthénium-polypyridyl.

Les propriétés photophysiques des transitions MLCT présentent un intérêt en biologie, notamment pour l'imagerie, le dosage de l' O_2 et la PDT. Les transitions de charge entre métal et ligand au sein d'un complexe ruthénium-polypyridyl sont également utilisées pour des applications photovoltaïques [200, 201].

Les complexes ruthénium-polypyridyl, à l'état fondamental, excités par la lumière passent à l'état excité $^1\text{MLCT}$ puis sont convertis en état excité triplet $^3\text{MLCT}$ par conversion intersystème (**Figure 22**).

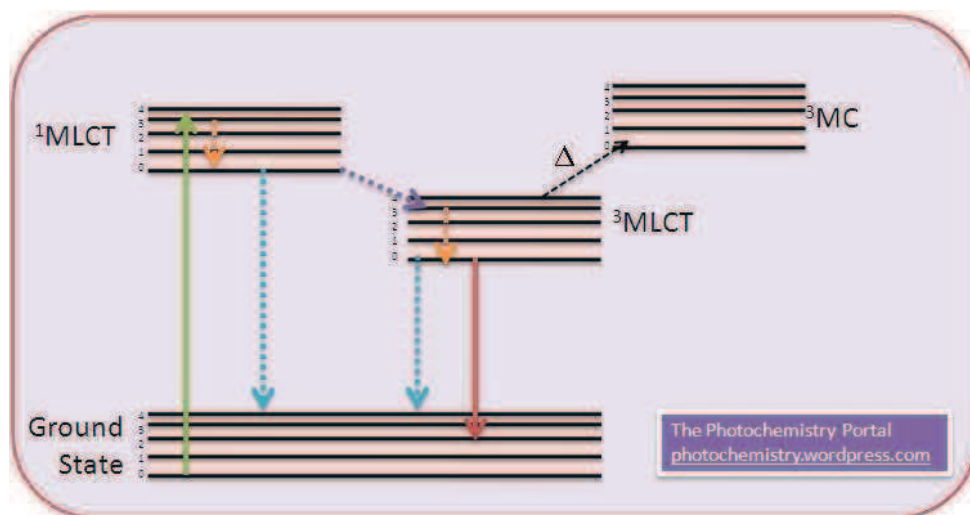


Figure 22 : Diagramme de Jablonski des complexes ruthénium-polypyridyl, d'après [199]. La flèche violette entre l'état excité $^1\text{MLCT}$ et l'état excité $^3\text{MLCT}$ représente la conversion intersystème. La flèche montante verte représente l'absorption d'un photon. Les flèches descendantes oranges représentent les conversions internes. Les flèches descendantes bleues et rouges les désactivations radiatives et non radiatives des états excités $^1\text{MLCT}$ et $^3\text{MLCT}$.

L'état $^3\text{MLCT}$ possède une durée de vie longue et contribue donc à une production élevée d' $^1\text{O}_2$ par transfert d'énergie à l' O_2 . En effet, le complexe $\text{Ru}(\text{bipyridyl})_3$ présente un rendement quantique de formation d' $^1\text{O}_2$ de 0,86 dans le méthanol [202]. L'état $^3\text{MLCT}$ est désactivé soit par phosphorescence, soit par transfert de charge au ligand, puis à l' O_2 pour la production d' $^1\text{O}_2$ (**Figure 23**).

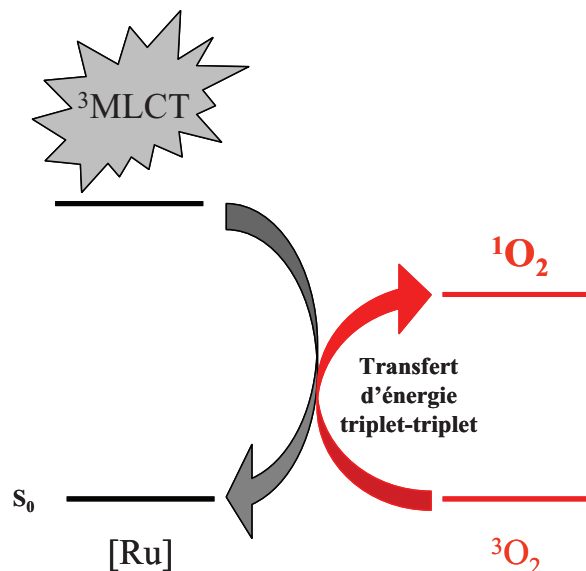


Figure 23 : Formation d' $^1\text{O}_2$ après excitation photonique de complexes ruthénium-polypyridyle, adapté de [203].

Les propriétés photophysiques des complexes à base de ruthénium peuvent être modulées en fonction des ligands du ruthénium (structure et rigidité du complexe) [203]. Les propriétés d'absorption à deux photons des complexes ruthénium-polypyridyle permettent leur utilisation pour des applications dans le proche IR [204, 205]. Dans cette optique, Boca *et al.* ont synthétisé un complexe ruthénium(II)(5-fluorène-1,10-phénanthroline, fonctionnalisé par du triéthylène glycol (TEG) dans le but d'améliorer la solubilité du complexe et sa perméabilité membranaire [204]. Le complexe a été internalisé dans les cellules de gliome F98, mais le ciblage nucléaire n'a pas été observé. Le complexe a présenté une phototoxicité après irradiation mono-photonique des cellules et une phototoxicité accrue après l'irradiation bi-photonique.

La production élevée d' $^1\text{O}_2$ et les applications biphotoniques des complexes ruthénium-polypyridyle présentent un grand intérêt en PDT. Ainsi pour cette thérapie, le ruthénium peut être conjugué à des arènes, des photosensibilisateurs et des composés polypyridyle.

2. Intérêt des complexes à base de ruthénium pour potentialiser l'efficacité en PDT

La revue *Ruthenium : potential interest in targeting strategies for photodynamic therapy*, soumise dans *Current Medicinal Chemistry*, explicite dans une première partie le devenir et le mécanisme d'action du Ru depuis son administration systémique jusqu'aux effets cytotoxiques engendrés. En deuxième partie, l'intérêt de son couplage à un photosensibilisateur est discuté et argumenté.

Le Ru s'affiche indéniablement comme une molécule d'intérêt thérapeutique en oncologie. Le Ru possède deux caractéristiques expliquant sa relative sélectivité pour les tissus néoplasiques :

- Le Ru(III) est transporté dans le sang par les transferrines plasmatiques. Les cellules tumorales, en prolifération accrue, surexpriment à leur surface les récepteurs à la transferrine pour s'assurer un apport élevé en fer.
- Après son incorporation, le Ru(III) est activé par réduction en Ru(II) dans l'environnement hypoxique tumoral. Seul le Ru(II) est réactif avec les biomolécules de la balance redox de la cellule (glutathion, acide ascorbique), les lipides membranaires et les acides nucléiques.

Une particularité très intéressante des complexes Ru liés à l'ADN est leur capacité à produire de $^1\text{O}_2$ après activation par la lumière. Cette propriété se rapproche de celle des molécules photoactivables. Cette revue discute l'intérêt de combiner Ru et photosensibilisateur pour une activation commune par la lumière et ainsi une éradication tumorale plus efficace.

Le couplage de complexes Ru(III) aux photosensibilisateurs présente plusieurs intérêts :

- améliorer le caractère amphiphile des photosensibilisateurs et donc leur solubilité en milieu aqueux ;
- améliorer la sélectivité tumorale par le transport spécifique des complexes Ru(III) par les transferrines ;
- combiner la cytotoxicité du Ru et la phototoxicité des photosensibilisateurs pour aboutir à un effet synergique.

Récemment, des photosensibilisateurs ont été couplés à des complexes Ru(III) ou Pt(II). De nombreuses études ont montré une augmentation de l'incorporation tumorale et une amélioration de l'efficacité anti-tumorale à l'issue d'un tel couplage.

**Ruthenium: potential interest in targeting strategies
for photodynamic therapy**

Marlène Pernot^a, Bruno Therrien^b, Céline Frochot^c, Muriel Barberi-Heyob^{a,c*}

^a CRAN, UMR 7039 Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Université de Lorraine, CNRS, Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre-lès-Nancy, France

^b Institute of Chemistry, University of Neuchâtel, Neuchâtel, Switzerland

^c LRGP, UPR 3349, Université de Lorraine, CNRS, Nancy, France

^d GDR CNRS 3049 "Médicaments Photoactivables-Photochimiothérapie (PHOTOMED)"

*To whom correspondence should be addressed.

CRAN, Centre Alexis Vautrin, Brabois, Avenue de Bourgogne,
54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France

Phone: + 33 3 83 59 83 76 ; Fax: + 33 3 83 59 83 78

E-mail: m.barberi@nancy.unicancer.fr

Abstract

For the last ten years, photodynamic therapy applied to cancer treatment, has been coupled to chemotherapy using metal-based drugs, such as platinum or ruthenium. Ruthenium-based drugs display less cytotoxic effects than platinum-based drugs while their high cytostatic and cytotoxic activities against some cancers have been widely described. *In vivo*, ruthenium complexes bind to blood protein, leading to a preferential uptake by tumor tissues moreover, these complexes are selectively activated by reduction reactions into tumor cells cytoplasm, making them interesting targeting units for other therapeutic agents such as photosensitizers. Coordinated to photosensitizers, ruthenium complexes display an antitumor activity and a carrier role. The complex mode of action of ruthenium will be also summarized in this review and advantages of combining ruthenium compounds with photosensitizer agents will be discussed.

Keywords: Activation-by-reduction hypothesis, anti-cancer targeted drug, combined phototherapy, DNA binding, photodynamic therapy, plasmatic transport, ruthenium.

Abbreviations

Bip	biphenyl
cAMP	adénosine monophosphate
CMP	cytosine monophosphate
Cym	<i>p</i> -cymene
DNA	desoxyribonucleotidic acid
GMP	guanosine monophosphate
GSH	glutathione
hTf	human transferrin
HSA	human serum albumine
Im	imidazole
IMP	inosine monophosphate
Ind	indazole
KP1019	indazolium [<i>trans</i> -RuCl ₄ (1 <i>H</i> -indazole) ₂]
NADH	nicotinamide adénine dinucléotide
NAMI-A	imidazolium [<i>trans</i> -RuCl ₄ (1 <i>H</i> -imidazole)(dimethyl sulfoxide- <i>S</i>)]
NO	nitric oxide
¹ O ₂	singlet oxygen
PDT	photodynamic therapy
Pt	platinum
RNA	ribonucleotidic acid
ROS	reactive oxygen species
Ru	ruthenium
RAPTA	(arene)-1,3,5-triaza-7-phosphaadamantane
Tf	transferrin
TfR	transferrin receptor
TMP	thymidine monophosphate

Introduction

Combined therapies to treat serious diseases have become a standard method to improve efficiency of the treatment. In cancer treatment, a combination of different classes of chemotherapeutic agents or a combination of chemotherapeutics with radiation is now a common form of treatment. In this purpose, photodynamic therapy molecules have been coupled to chemotherapy agents such as platinum. However, despite the success of cisplatin in the clinic [1], platinum-based drugs are far from being perfect, they show a general toxicity and resistance mechanisms are often encountered. Recently, ruthenium became an attractive alternative to platinum, since ruthenium compounds are known to display less general toxicity than their platinum counterparts [2], primarily due to their iron detoxification paths inside the body [3-5]. Moreover, ruthenium-containing drugs are not sensitive to resistance mechanisms [3, 6] and exhibit interesting biological properties [3, 4, 7, 8]. They have been shown to act as cytostatic and cytotoxic drugs on colorectal tumor cells both *in vitro* and *in vivo* [9-11]. Among other tumors they display high activity against colorectal carcinomas [7, 12], lung carcinoma [8]. However, their properties strongly depend on the nature of their coordinated ligands [13-16] (see Fig. (1)).

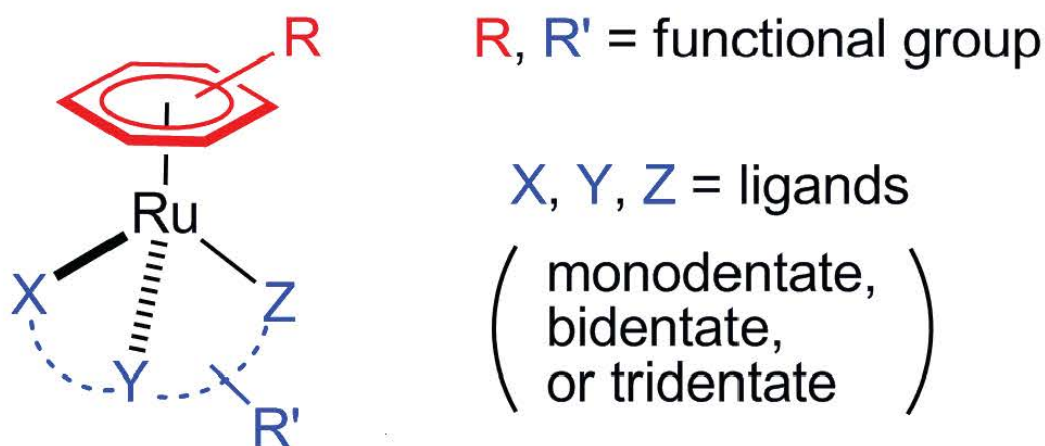


Fig. (1). General structure of ruthenium complexes.

Among ruthenium complexes, two compounds have successfully completed phase I clinical trials, namely, NAMI-A (imidazolium [*trans*-RuCl₄(1*H*-imidazole)(dimethyl sulfoxide-*S*)]), and KP1019 (indazolium [*trans*-RuCl₄(1*H*-indazole)₂] (see Fig. (2)). Many studies on their mode of action and on structure-activity relationships were performed; however, many aspects of the tumor-inhibiting action displayed by Ru complexes are still unknown. These two octahedral Ru(III) complexes are structurally similar, and surprisingly exhibit a completely different mode of action. Briefly, KP1019 shows significant antineoplastic activity against a wide number of preclinical tumor models, including cisplatin resistant colorectal tumors and some primary explanted human tumors, and it has been found to be almost devoid of side-effects [17, 18]. Interestingly, serum protein uptake seems to play an important role in the overall mode of action of KP1019 as many studies support the transferrin-transport hypothesis: KP109 was found to interact specifically with apotransferrin [17-19]. On the other hand, NAMI-A is non cytotoxic and failed the usual screens for anticancer agents [20], but has a high and selective inhibitory effect on tumor metastasis in all solid tumors on which it has been tested. The mode of action of NAMI-A seems to combine an anti-angiogenic effect with interactions with the extracellular matrix and cell surface [19, 21].

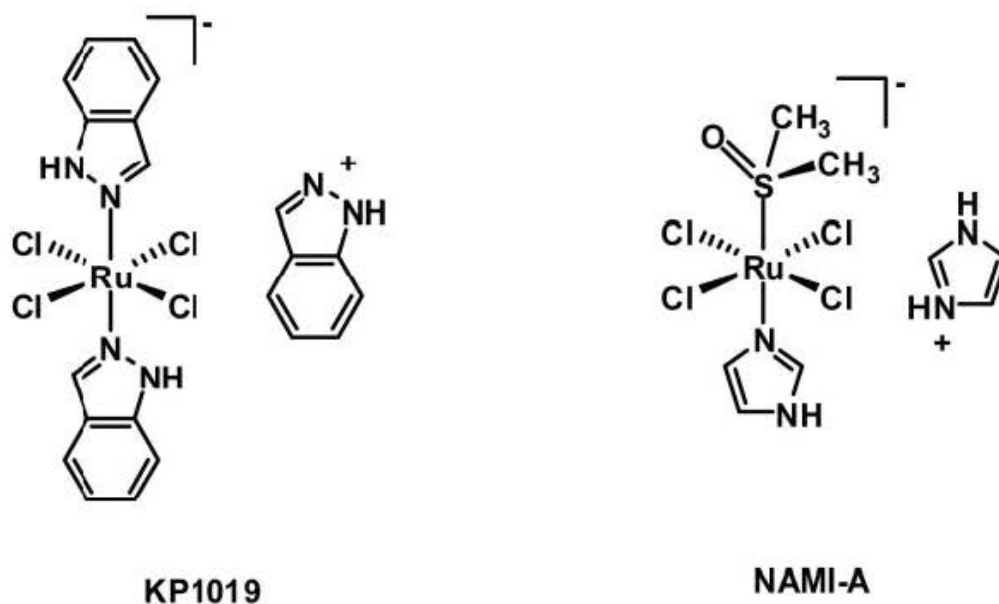


Fig. (2). NAMI-A (imidazolium [*trans*-RuCl₄(1*H*-imidazole)(dimethyl sulfoxide-*S*)]), and KP1019 (indazolium [*trans*-RuCl₄(1*H*-indazole)₂] chemical structures.

Ruthenium compounds are arguably the best candidates to replace platinum in cancer treatment. Their ability to mimic the behaviour of iron, by binding to proteins in the blood compartment, makes them ideally suited to metal-based drug design. In this context, it is not surprising that ruthenium complexes and photosensitizer scaffolds were combined to elaborate conjugated photosensitizers for PDT.

This review aims to describe the different mode of action of ruthenium compounds, despite the large number of ligands and their different behaviours. The advantage of combining photosensitizer with ruthenium moieties will be also discussed.

Ruthenium-based compounds in the organism. Plasmatic proteins binding of ruthenium

Therapeutic ruthenium compounds are usually administrated intravenously. Therefore, what happens when these therapeutic metallic molecules enter the bloodstream? As many metallic elements in a cationic form, they have a general tendency to interact with biological molecules. Numerous drugs are known to bind to plasma proteins when entering the bloodstream [22, 23]. The extent and nature of these interactions have a profound effect on the distribution of the drug into other compartments, and on its therapeutics as well as its toxic effect. To understand these interactions, it is important to know the concentrations of the relevant blood components. The blood plasma contains 90% of water, the rest being dissolved substances such as proteins (albumin, transferrin, fibrinogen), glucose, sodium chloride, anions (carbonate, phosphate), amino acids, hormones, vitamins, urea, *etc.* [22]. Table (A) lists the relevant bioligands with their respective concentrations in human plasma. Albumin and transferrin are the most important proteins in the plasma, but albumin is 17-fold more concentrated than transferrin. Because of these high concentrations (630 μM and 37 μM , respectively), these proteins play an important role in the efficiency of transport of metal ions or complexes in the bloodstream. Human serum albumin (HSA) is a globular protein, consisting of a single polypeptide chain of 585 amino acids and it has an average half-life of 19 days [24]. It has many important physiological functions, such as acting as a solubilising agent for long chain fatty acids and as transport vehicle for bivalent cations (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Ca^{2+} and Zn^{2+}) in the blood [24]. HSA is also characterized by its high capacity to bind a large variety of drugs (*e.g.* warfarin) [25]. Because of the high concentration of HSA in serum, the prevailing role of this protein in drug pharmacokinetics and pharmacodynamics is crucial. The design of new drugs should take into account their binding affinity to HSA to optimize their pharmacokinetic behaviour. HSA possesses two main drug-binding sites, site I and site II, which are localised at sub domains IIA and IIIA, respectively [25]. Furthermore, strong

binding of the drugs to HSA may prevent their metabolic clearance and thus may increase their lifetime [25]. HSA is one of the most common nonspecific binding proteins, being the most important nonspecific transporter protein in the circulatory system [25]. It is known to accumulate in malignant and inflamed tissues and its clearance from tumor tissue is reduced due to missing or defective lymphatic drainage system [24]. As an alternative to drug targeting, passive tumor targeting conjugating a therapeutic compound with albumin is an attractive approach to improve the selectivity and the overall pharmacokinetic profile of metallodrugs [24, 26].

Table (A). Concentration of major components of blood of healthy human subjects which may act as ligands towards Ru-centres, according to ref. [22].

Cl ⁻	ca. 100mM
Carbonate	25 mM
Glycine (Gly)	2.3 mM
Lactate	1.51 mM
Phosphate	1.1 mM
HSA	630 μ M
Citrate	99 μ M
Histidine (His)	77 μ M
Ascorbate	ca. 60 μ M
hTf	37 μ m
Cysteine (Cys)	33 μ M
Glutathione (GSH)	ca. 1-5 μ M

Abbreviations: hTf, human Transferrin; HSA, Human Serum Albumine.

Another crucial plasmatic protein in drug transport mechanism is transferrin (Tf). Unlike HSA, Tf possesses a receptor (TfR), which expression on the tumor-cell surface is upregulated, partly due to an increased requirement for iron in rapidly growing cells [27]. This property makes this protein the most important specific transporter in the circulatory system. Furthermore, only around 30% of the circulating proteins are occupied with iron, so it is a potential binder for other metal ions in the body [22]. Using Tf is a particularly promising strategy for the specific transport of drugs to tumor site and into the cells through the transferrin receptor pathway, to avoid side effects. Human transferrin (hTf) [28] is a single-chain non-heme glycoprotein with 679 amino acids folded into two structurally similar lobes connected by a short peptide [29]. Each lobe contains one specific hydrophilic deep cleft bearing a binding site for iron [29]. The “binding pockets” in both lobes consist of two tyrosines, one aspartic acid and one histidine [29]. The protein undergoes conformational changes upon iron binding, changing from an “opened” to a “closed-form” whether iron-free or iron-loaded. The closed-form is essential for selective recognition by TfR [29]. In the presence of carbonate, the protein binds strongly Fe^{3+} ions. The presence of carbonate in the active site is essential for Fe^{3+} -transferrin binding to receptor [29]. Only diferric transferrin (Fe^{2+} -hTf) is tightly bound by the TfR located on the cell surface and is taken up into an endosome, where iron is released [29]. Besides Fe^{3+} , hTf can bind strongly to a range of other metal ions, and the fact that many heterometal-hTf complexes are still recognized by the TfR makes this approach quite attractive [30].

Since both albumin and Tf play important roles in the distribution and transport of different compounds, it is essential to know their interactions with ruthenium complexes. These interactions have been widely studied during the last twenty years.

Keppler *et al.*, described anticancer ruthenium(III) complexes with N-heterocycles, and among these, the complexes with the ligands imidazole (ru-im) and indazole (ru-ind) were the most promising for cancer treatment [31]. First, they showed that binding of ru-ind to apotransferrin proceeds through the formation of two intermediates which bind rapidly to the protein [32, 33]. This reaction takes place only in the presence of bicarbonate. Without bicarbonate in the buffer there is no formation of intermediates and no binding to apotransferrin. However, the authors noted that protein binding of ru-im takes place without the formation of intermediates [32, 33]. Moreover, they also showed that the preferred binding sites for the Ru(III) complexes are at histidine (His) residues of the protein, presumably following the loss of one or more of the chloride ligands [33]. In the case of ru-

ind, binding to apotransferrin occurs specifically at His 253 in the open cleft of the N-terminal of the protein whereas ru-im binds apotransferrin at both iron binding sites, His 253 and His 597, as well as other non-specific sites where histidines are exposed on the protein surface [33]. In 2000, they demonstrated that the binding of Ru(III) complexes on HSA changed the protein conformation [34]. Indeed, the decrease in the α -helical content was related to the molar ratio Ru/HSA. An excess of ruthenium complex increases the disordered structure content in the protein. This conformational change is more effective when HSA binds Ru-im complex than Ru-ind complex [34]. The interaction between HSA and Ru(III) complexes induces a decrease in the binding amounts of heme and bilirubin on HSA [34]. Moreover, they studied the cellular uptake of KP1019, mediated by transferrin [35]. They compared the cellular incorporation of free KP1019, apotransferrin-bound KP1019 and Fe(III)-transferrin-bound KP1019. There was a statistically significant increase in cellular accumulation of KP1019 when bound to Fe(III)-transferrin compared to the other complexes [35]. This result suggests that iron binding plays a major role in obtaining a protein conformation which favours recognition by the transferrin receptors on the cell surface.

The role of serum protein binding is crucial for the bioavailability of some ruthenium compounds, preventing hydrolytic process and precipitation at pH 7.4. An equilibrium seems to exist between the Ru-hTf bound and Ru-HSA bound forms, and it was also suggested that albumin could act as an *in vivo* ruthenium storage while hTf would play a primary role for the active transport into the cells through the transferrin receptor pathway [18].

“Activation-by-reduction” hypothesis

Recently, Pessoa and Tomaz [22] reviewed the transport of therapeutic vanadium and ruthenium complexes by blood plasma components. In a general way, it is important to know that Ru(III) is the predominant oxidation state in physiological conditions, while Ru(II) is accessible in the presence of biological reducing agents [36], and Ru(IV) can also be formed by oxidation with O_2 and H_2O_2 .

Ruthenium(III) complexes in aqueous media exhibit an aquation reaction depending on pH, temperature and buffer system [14, 22, 37-43]. Aquation consists of a ligand substitution on the metal centre by one water molecule, with the concomitant release of the leaving group. The water molecule is weakly bonded or more strongly as a ligand to form the “aqua” complex, which is an electrophilic ion usually more reactive than the parent complex [38, 41]. Because of the “activation-by-reduction” hypothesis, an understanding of the mechanism of ruthenium reduction is necessary to design new metal-based drugs. It was shown that the

cytotoxicity efficiency of ruthenium compounds depends on their redox potential and that the nature of the ligand has important effects on the complex redox potential [14]. Ru(III) and Ru(IV) complexes maintain their ligand environment geometry while Ru(II) complexes display a different geometry, making them more reactive to target biomolecules [36]. It has also been established that a more reducibility of ruthenium complexes reflects a high reactivity toward nucleophilic biomolecules [14]. Effectively, the Ru(II) species are generally less inert, have a higher propensity for ligand exchange reactions and may therefore interact with target molecules more rapidly [14]. Jakupec *et al.* [14] experimented ruthenium compounds with different reduction potential to study their cellular uptake and their *in vitro* antitumor potency. The hydrophilic anionic complexes cellular uptake is inversely correlated with the charge of the complexes. The uptake of the cationic complexes is higher than that of the anionic complexes and the neutral complex is taken up to a much higher extent than the other complexes. However, the antitumor potency increases with the reduction potential of the compounds. Moreover, a recent study demonstrated that the Ru(III) complex KP1019 accumulated in cells in a much better extent than other ruthenium compounds [44].

The reduction can occur in the blood plasma where ascorbic acid is the most relevant reducing agent, but this process might be prevented by fast protein binding. In the cells, glutathione as well as single-electron-transfer proteins in the presence of NADH are capable of reducing Ru(III). Glutathione (GSH), a cystein-containing tripeptide, is involved in the reduction of some Pt(IV) and Ru(III) complexes to the active Pt(II) and Ru(II) species [22, 36, 45]. It was evidenced that Ru(II) complexes coordinate to L-cystein residue in aqueous solution [39] and that addition of GSH in a solution buffer containing KP1019 and GMP (Guanosine MonoPhosphate) nucleotide nearly doubled the decrease of free GMP [36]. GSH usually scavenges and sequesters heavy metal ions by coordinating them through its sulfhydryl, thus inhibiting their binding to proteins and nucleic acids. Nevertheless, in some cases, GSH reduces metal ions, such as Pt(IV) anticancer drugs, to species that coordinate or otherwise react with DNA [45]. Moreover, the reduction process can take place without reducing agents in the hypoxic tumor tissue where its rapid growth leads to a more reductive and acidic environment in consequence of an insufficient formation of new blood vessels and concomitant low oxygen and nutrient supply.

The influence of different parameters, such as pH, compounds concentration and buffer system, on the behaviour of ruthenium complexes has been widely studied. Wang and co-workers [39] showed that L-cystein amino acid residue binding to Ru(III) strongly depends on

pH and the molar ratio between Ru(III) and L-cystein. The formation of Ru-cystein adducts were detected only when the pH was below 5. Above 5, the hydrolysis product of Ru(III) became dominant, and up to neutral pH, more L-cystein were oxidized to cystine, and less bound to ruthenium. Schulga *et al.*, [36] demonstrated that the reduction rate of KP1019 depends on the system buffer, the pH and the molar ratio between Ru(III) complex and GSH. When changing from unbuffered to buffered solution, the complete reduction of KP1019 was improved. However, the authors did not find any pH dependency of the Ru(III) complex but could observe an increase in reducing strength of the reducing agents with increasing pH.

This “Activation-by-reduction” should be favoured in the hypoxic and slightly acidic microenvironment found in insufficiently supplied regions of solid tumors. Although it soon became obvious that the activity profile of ruthenium complexes and their mode of action differ substantially from those of classical anticancer metal drugs such as cisplatin and carboplatin, knowledge about the mechanisms by which they exert antineoplastic effects is still fragmentary. By analogy with platinum complexes, DNA has been assumed to be the critical target site, but ruthenium interaction with DNA has therefore been subject to limited investigations. Following exposure of tumor cells to KP1019, DNA interstrand cross-links and DNA-protein cross-links have been detected. It was also demonstrated that ruthenium complexes act by induction of apoptosis [46-48]. In colorectal tumor cells (SW480), KP1019 induced mitochondria depolarization, activation of caspase 3 and decreased the expression of the anti-apoptotic gene *bcl₂* [46]. Mutation of p53 did not prevent cell loss induced by these ruthenium-indazolium complexes [46]. KP1019 induced oxidative stress and DNA damage in cells [48]. Moreover, ruthenium compound-induced apoptosis decrease when antioxidant was added to treated cells [48]. Ruthenium-based drugs have also been shown to induce the activity of components of the endoplasmic reticulum stress pathway [3].

Binding partners for ruthenium-based metallodrugs

Ruthenium drugs have been shown to bind to nucleotides, DNA and RNA *in vitro* in cell-free medium [40, 43, 49-52], adduct formation proceeds more slowly compared to cisplatin [53]. For example, Groessel and co-workers [53] showed that NAMI-A was more reactive towards the double-stranded oligonucleotides than the other ruthenium-based compounds RAPTA-T and KP1019 and the platinum-derivative compounds oxaliplatin and carboplatin. However, NAMI-A remains less reactive towards DNA than cisplatin. They also demonstrated that

guanine is the preferred binding partner for both platinum and ruthenium-based metallodrugs, even if other bases are present in large excess. Adenine and thymine could also serve as a binding partner for the ruthenium compounds. The binding of ruthenium-based metallodrugs to nucleobases were widely studied such as the binding of Ru(II) to guanine N7 atom [1, 40, 49]. First, the Ru(II) complex undergoes hydrolysis in water to give the reactive aqua complex Ru-OH₂, followed by rapid reaction with the 5'-phosphate of 5'-GMP, and then a slow displacement of bound phosphate by N7 [40]. No phosphate intermediates were detected for cGMP. Ru(II) binds to N7 and N1 of inosine and phosphate-bound intermediates are formed with 5'-IMP (Inosine MonoPhosphate), 5'-CMP (Cytosine MonoPhosphate) and 5'-TMP (Thymidine MonoPhosphate) form 5'-phosphate and N3 adducts with Ru(II). A reaction is observed between Ru(II) and cAMP (Adénosine MonoPhosphate cyclique) or adenosine, and only a 5'-phosphate binding is formed with 5'-AMP [40]. The reactivity of the various binding sites of nucleobases towards Ru(II) at neutral pH decrease in the order G(N7) > T(N3) > C(N3) > A(N7, N1) [37]. However, the mode of interaction with DNA varies depending on the structure of both DNA and ruthenium complex [49]. Ruthenium complexes can adapt to a DNA environment by simple arene rotation [49]. In their study, Gossens and co-workers [49] showed that their *trans*-reactant adduct is less stable than the *cis* adduct. In highly flexible single-stranded DNA, the N7 atom of guanine constitutes the main target for Ru(II) [49]. The DNA-Ru interactions induce conformational changes in DNA such as intra-strand cross-linking, inter-strands cross-linking, protein cross-linking, or intercalation. Frühauf and Zeller described these interactions, demonstrating that ruthenium compounds induce much less DNA cross-links than cisplatin, and the major part of these cross-links concern proteins [50]. It have been also showed that ruthenium complexes, at high concentration, are able to intercalate into DNA [51].

Because of the low nuclear targeting [44, 47, 53] and the high anti-tumor efficiency of ruthenium compounds, it have been hypothesized that DNA is not the main ruthenium-based drugs target [52]. It have been established that ruthenium compounds bind to amino acids such as cystein-, histidine- and methionine-residues [39, 42]. This capacity to bind amino acids allows ruthenium complexes to bind to extra- and intra-cellular proteins. Heffeter *et al.*, [44] found that ruthenium compounds bind to cytosolic proteins with molecular weight up to 700 kDa. This fraction probably contains mainly polymeric proteins (*e.g.* cytoskeleton components) or large protein complexes (*e.g.* ribosomes, proteins from the respiratory chain). Ruthenium complexes are also known to bind to cytochrome c, which contains two accessible histidine residues, His26 and His33 [42].

Photoactivated cleavage of DNA by ruthenium complexes

Some ruthenium complexes can act as luminescence markers of DNA and photocleave the DNA backbone by sensitization of singlet oxygen ($^1\text{O}_2$) [54, 55] thanks to their octahedral geometry [54-57]. Most of these complexes are coordinated with symmetric aromatic ligands such as polypyridyl derivatives. Photoactivation of ruthenium complexes happens only when coordinated with DNA [54, 55, 57]. Moreover, it has been shown that the maximum luminescence wavelength shifts according to coordination of Ru(II) complexes to polyA-polyT or polyC-polyG oligomers [54].

This ruthenium complexes feature is quite identical as these of photosensitizer used for PDT [58].

Ruthenium-conjugated photosensitizer for PDT

The selectivity of PDT as an anti-cancer treatment relies on the local generation of cytotoxic reactive oxygen species (ROS) in the tumor tissue, due to both preferential uptake of the photosensitizer by malignant tissue and subsequent localized light irradiation [58]. Indeed, the photosensitizer, at the concentrations used for PDT, is non-toxic in the dark and becomes photocytotoxic only when light at an appropriate wavelength is applied [58]. The targeted delivery of photosensitizers to specific cells is a major problem in PDT of cancer, and one area of importance is photosensitizer targeting. In this sense, an arsenal of targeting approaches has been described in the literature [59]. To improve tumor cells selectivity, photosensitizer can be coupled to a tumor targeting moiety such as peptide [60-65], folic acid [66], sugar [67] *via* a direct coupling or using linkers/spacers. The coupling of a vector can either (i) modulate the amphiphilicity and/or enhance the solubility of these compounds in biological media and prevent self-aggregation (passive targeting), or (ii) promote cellular recognition (active targeting), with the aim to increase the biological efficiency. Several of these targeting strategies offer the advantage of transporting the photosensitizer molecule across the cell membrane, resulting in intracellular accumulation of the photoactivable compound, which may allow for targeting photosensitive intracellular sites, and thus improving photodynamic efficiency. To improve their cellular uptake and photocytotoxicity, photosensitizers can also be coupled to chemotherapeutic agents. Complexes of photosensitizers coordinated to ruthenium complexes have been designed and tested *in vitro* [68-70]. These complexes indeed aim to (i) combine the cytotoxicity of ruthenium with the photodynamic activity of photosensitizers, (ii) improve tumor selectivity cellular uptake of

photosensitizers thanks to the specific transport of ruthenium to tumor cells by transferrin, (iii) increase hydrophilicity of photosensitizers according to ruthenium ligands, (iiii) combine activation of photosensitizer and ruthenium-induced photocleavage of DNA by irradiation of the tumor (see Fig. (3)). Herein, specific tumor irradiation induces selective DNA photocleavage.

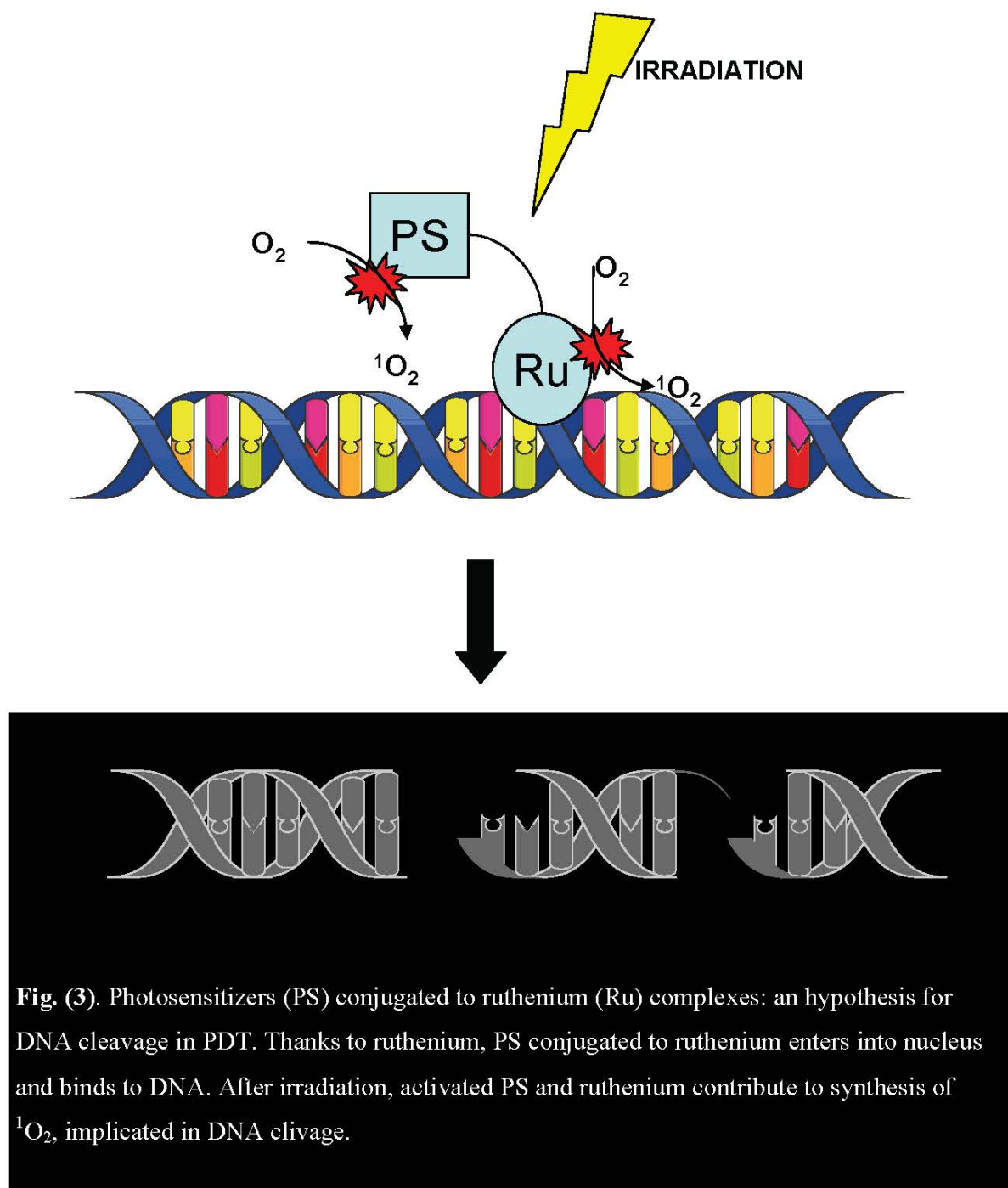


Fig. (3). Photosensitizers (PS) conjugated to ruthenium (Ru) complexes: an hypothesis for DNA cleavage in PDT. Thanks to ruthenium, PS conjugated to ruthenium enters into nucleus and binds to DNA. After irradiation, activated PS and ruthenium contribute to synthesis of ¹O₂, implicated in DNA clivage.

In this purpose, our group has coordinated arene ruthenium moieties to pyridylporphyrins [68, 69]. They showed that ruthenium(II) organometallic complexes enhance uptake of the porphyrin by human melanoma cells and that these complexes remain intact following their uptake by cells [69]. Moreover, the organometallic fragments on the pyridylporphyrin ring did not modify the photophysical properties of the photosensitizer: phototoxicity of their ruthenium complexes appeared at 5 J/cm² of light exposure ($\lambda = 652$ nm, fluence rate 20 mW/cm²) [69]. Using fluorescence microscopy, they studied cellular compartmentation of their complexes and noted that they accumulated in cytoplasm of the melanoma cells but neither in the nucleus nor in the lysosomes [69]. To optimize their compounds structures, they synthesized a series of arene ruthenium porphyrin compounds containing either one or four arene ruthenium units coordinated to 4-pyridylporphyrin or 3-pyridylporphyrin photosensitizer derivatives [68]. Photodynamic studies revealed that the nature of the pyridylporphyrin isomer is more important than the degree of substitution of the tetrapyrrole ring. 3-pyridyl photosensitizers were more photosensitizing than 4-pyridyl photosensitizers at an equivalent degree of substitution. Moreover, the tetranuclear complexes presented a very different pattern of accumulation in the cytoplasm depending on the particular isomer of tetrapyridylporphyrin. Recently, other porphyrin-ruthenium conjugates studies have been reviewed [15].

Lottner *et al.*, [71] developed an hematoporphyrin-platinum(II) conjugate and demonstrated that hematoporphyrin-platinum(II) conjugate display the same antiproliferative activity than cisplatin in J82 tumor cells. The hematoporphyrin-platinum conjugates showed a cytotoxic activity in the dark resulting from the platinum moiety of the complexes, more in cancer cells than in healthy urothelial cells. The reference substance cisplatin damaged healthy urothelial cells to the same extent as J82 tumor cells.

In PDT, hypoxia during light irradiation can lead to poorer tumor response, due to oxygen concentration decrease and thus ¹O₂ concentration decrease. One way to improve PDT would be to use nitric oxide (NO) to enhance tumor microvascularisation [58, 72]. Thus ruthenium nitrosyl phthalocyanine complex were synthesized and photochemical and photophysical properties of the complex have been performed [73]. The authors demonstrated that the synergistic effect of NO and ¹O₂ produced by the photosensitizer complex exerts considerably beneficial effects in terms of cell viability decrease.

Conclusion

The reported examples in this review illustrate how the metal and its ligand can modify the biological activity of the metal-based drugs. The specific transport of ruthenium to tumor cells by transferrin and its specific activation by reduction in tumor cells explain the fact that this metal compound is an interesting therapeutic agent inducing few side effects. When combined to a photosensitizer, ruthenium complexes act as tumor cells carrier and help the photosensitizer to enter into the cells. Moreover, the light irradiation of the tumor for PDT treatment could selectively activate ruthenium complex conjugated to the photosensitizer for DNA photocleavage.

With appropriate ligands chemistry on ruthenium and photosensitizer with appropriate photophysical features, combination of chemotherapy and PDT could display a promising future for cancer treatment.

Acknowledgements

This work was supported by the research funds of the French Ligue Nationale Contre le Cancer, ANR project no. ANR-08-PCVI-0021-01 Nano-VTP and CPER.

References

- [1] Ho, Y.P.; Au-Yeung, S.C.; To, K.K. Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives. *Med. Res. Rev.*, **2003**, 23(5), 633-655.
- [2] Ang, W.; Dyson, P. Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: towards targeted chemotherapy. *Eur. J. Inorg. Chem.*, **2006**, 4003-4018.
- [3] Meng, X.; Leyva, M.L.; Jenny, M.; Gross, I.; Benosman, S.; Fricker, B.; Harlepp, S.; Hebraud, P.; Boos, A.; Wlosik, P.; Bischoff, P.; Sirlin, C.; Pfeffer, M.; Loeffler, J.P.; Gaiddon, C. A ruthenium-containing organometallic compound reduces tumor growth through induction of the endoplasmic reticulum stress gene CHOP. *Cancer Res.*, **2009**, 69(13), 5458-5466.
- [4] Scolaro, C.; Bergamo, A.; Brescacin, L.; Delfino, R.; Cocchietto, M.; Laurenczy, G.; Geldbach, T.J.; Sava, G.; Dyson, P.J. In vitro and in vivo evaluation of ruthenium(II)-arene PTA complexes. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48(12), 4161-4171.
- [5] Gkouvasos, K.; Papanikolaou, G.; Pantopoulos, K. Regulation of iron transport and the role of transferrin. *Biochim. Biophys. Acta*, **2011**, 1820(3), 188-202.
- [6] Morris, R.E.; Aird, R.E.; Murdoch Pdel, S.; Chen, H.; Cummings, J.; Hughes, N.D.; Parsons, S.; Parkin, A.; Boyd, G.; Jodrell, D.I.; Sadler, P.J. Inhibition of cancer cell growth by ruthenium(II) arene complexes. *J. Med. Chem.*, **2001**, 44(22), 3616-3621.
- [7] Garzon, F.T.; Berger, M.R.; Keppler, B.K.; Schmahl, D. Comparative antitumor activity of ruthenium derivatives with 5'-deoxy-5-fluorouridine in chemically induced colorectal tumors in SD rats. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **1987**, 19(4), 347-349.
- [8] Sava, G.; Pacor, S.; Zorzet, S.; Alessio, E.; Mestroni, G. Antitumour properties of dimethylsulphoxide ruthenium (II) complexes in the Lewis lung carcinoma system. *Pharmacol. Res.*, **1989**, 21(5), 617-628.
- [9] Galeano, A.; Berger, M.R.; Keppler, B.K. Antitumor activity of some ruthenium derivatives in human colon cancer cell lines in vitro. *Arzneimittelforschung*, **1992**, 42(6), 821-824.
- [10] Berger, M.R.; Garzon, F.T.; Keppler, B.K.; Schmahl, D. Efficacy of new ruthenium complexes against chemically induced autochthonous colorectal carcinoma in rats. *Anticancer Res.*, **1989**, 9(3), 761-765.
- [11] Sava, G.; Bergamo, A. Ruthenium-based compounds and tumour growth control (review). *Int. J. Oncol.*, **2000**, 17(2), 353-365.
- [12] Galanski, M.; Arion, V.B.; Jakupec, M.A.; Keppler, B.K. Recent developments in the field of tumor-inhibiting metal complexes. *Curr. Pharm. Des.*, **2003**, 9(25), 2078-2089.
- [13] Suss-Fink, G. Arene ruthenium complexes as anticancer agents. *Dalton Trans.*, **2010**, 39(7), 1673-1688.
- [14] Jakupec, M.A.; Reisner, E.; Eichinger, A.; Pongratz, M.; Arion, V.B.; Galanski, M.; Hartinger, C.G.; Keppler, B.K. Redox-active antineoplastic ruthenium complexes with indazole: correlation of in vitro potency and reduction potential. *J. Med. Chem.*, **2005**, 48(8), 2831-2837.
- [15] Smith, G.S.; Therrien, B. Targeted and multifunctional arene ruthenium chemotherapeutics. *Dalton Trans.*, **2011**, 40(41), 10793-10800.
- [16] Cetinbas, N.; Webb, M.I.; Dubland, J.A.; Walsby, C.J. Serum-protein interactions with anticancer Ru(III) complexes KP1019 and KP418 characterized by EPR. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2010**, 15(2), 131-145.
- [17] Hartinger, C.G.; Zorbas-Seifried, S.; Jakupec, M.A.; Kynast, B.; Zorbas, H.; Keppler, B.K. From bench to bedside--preclinical and early clinical development of the

- anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A). *J. Inorg. Biochem.*, **2006**, 100(5-6), 891-904.
- [18] Hartinger, C.G.; Jakupec, M.A.; Zorbas-Seifried, S.; Groessl, M.; Egger, A.; Berger, W.; Zorbas, H.; Dyson, P.J.; Keppler, B.K. KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients. *Chem. Biodivers.*, **2008**, 5(10), 2140-2155.
- [19] Levina, A.; Mitra, A.; Lay, P.A. Recent developments in ruthenium anticancer drugs. *Metallomics*, **2009**, 1(6), 458-470.
- [20] Dyson, P.J.; Sava, G. Metal-based antitumour drugs in the post genomic era. *Dalton Trans.*, **2006**, (16), 1929-1933.
- [21] Jakupec, M.A.; Galanski, M.; Arion, V.B.; Hartinger, C.G.; Keppler, B.K. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Trans.*, **2008**, (2), 183-194.
- [22] Pessoa, J.C.; Tomaz, I. Transport of therapeutic vanadium and ruthenium complexes by blood plasma components. *Curr. Med. Chem.*, **2010**, 17(31), 3701-3738.
- [23] Hamblin, M.R.; Newman, E.L. Photosensitizer targeting in photodynamic therapy. II. Conjugates of haematoporphyrin with serum lipoproteins. *J. Photochem. Photobiol. B*, **1994**, 26(2), 147-157.
- [24] Kratz, F. Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. *J. Control. Release*, **2008**, 132(3), 171-183.
- [25] Colmenarejo, G. In silico prediction of drug-binding strengths to human serum albumin. *Med. Res. Rev.*, **2003**, 23(3), 275-301.
- [26] Ang, W.H.; Daldini, E.; Juillerat-Jeanneret, L.; Dyson, P.J. Strategy to tether organometallic ruthenium-arene anticancer compounds to recombinant human serum albumin. *Inorg. Chem.*, **2007**, 46(22), 9048-9050.
- [27] Richardson, D.R.; Ponka, P. The molecular mechanisms of the metabolism and transport of iron in normal and neoplastic cells. *Biochim. Biophys. Acta*, **1997**, 1331(1), 1-40.
- [28] Gomme, P.T.; McCann, K.B.; Bertolini, J. Transferrin: structure, function and potential therapeutic actions. *Drug Discov. Today*, **2005**, 10(4), 267-273.
- [29] Qian, Z.M.; Li, H.; Sun, H.; Ho, K. Targeted drug delivery via the transferrin receptor-mediated endocytosis pathway. *Pharmacol. Rev.*, **2002**, 54(4), 561-587.
- [30] Sun, H.; Li, H.; Sadler, P.J. Transferrin as a metal ion mediator. *Chem. Rev.*, **1999**, 99(9), 2817-2842.
- [31] Keppler, B.; Henn, M.; Juhl, U.; Berger, M.; Niebl, R.; Wagner, F. In: *Progress in Clinical Biochemistry and Medicine*; Clarke M.J., Ed.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **1989**; Vol. 10, pp. 41-69.
- [32] Kratz, F.; Hartmann, M.; Keppler, B.; Messori, L. The binding properties of two antitumor ruthenium(III) complexes to apotransferrin. *J. Biol. Chem.*, **1994**, 269(4), 2581-2588.
- [33] Kratz, F.; Keppler, B.K.; Messori, L.; Smith, C.; Baker, E.N. Protein-binding Properties of two Antitumour Ru(III) Complexes to Human Apotransferrin and Apolactoferrin. *Met. Based Drugs*, **1994**, 1(2-3), 169-173.
- [34] Trynda-Lemiesz, L.; Karaczyn, A.; Keppler, B.K.; Kozlowski, H. Studies on the interactions between human serum albumin and trans-indazolium (bisindazole) tetrachlororuthenate(III). *J. Inorg. Biochem.*, **2000**, 78(4), 341-346.
- [35] Pongratz, M.; Schluga, P.; Jakupec, M.; Arion, V.; Hartinger, C.; Allmaier, G.; Keppler, B. Transferrin binding and transferrin-mediated cellular uptake of the ruthenium coordination compound KP1019, studied means of AAS, ESI-MS and CD spectroscopy. *J. Anal. At. Spectrom.*, **2004**, 19, 46-51.

- [36] Schluga, P.; Hartinger, C.G.; Egger, A.; Reisner, E.; Galanski, M.; Jakupec, M.A.; Keppler, B.K. Redox behavior of tumor-inhibiting ruthenium(III) complexes and effects of physiological reductants on their binding to GMP. *Dalton Trans.*, **2006**, (14), 1796-1802.
- [37] Pizarro, A.M.; Sadler, P.J. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie*, **2009**, 91(10), 1198-1211.
- [38] Dougan, S.J.; Melchart, M.; Habtemariam, A.; Parsons, S.; Sadler, P.J. Phenylazo-pyridine and phenylazo-pyrazole chlorido ruthenium(II) arene complexes: arene loss, aquation, and cancer cell cytotoxicity. *Inorg. Chem.*, **2006**, 45(26), 10882-10894.
- [39] Wang, F.; Chen, H.; Parkinson, J.A.; Murdoch Pdel, S.; Sadler, P.J. Reactions of a ruthenium(II) arene antitumor complex with cysteine and methionine. *Inorg. Chem.*, **2002**, 41(17), 4509-4523.
- [40] Chen, H.; Parkinson, J.A.; Morris, R.E.; Sadler, P.J. Highly selective binding of organometallic ruthenium ethylenediamine complexes to nucleic acids: novel recognition mechanisms. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, 125(1), 173-186.
- [41] Cebrian-Losantos, B.; Reisner, E.; Kowol, C.R.; Roller, A.; Shova, S.; Arion, V.B.; Keppler, B.K. Synthesis and reactivity of the aquation product of the antitumor complex trans-[Ru(III)Cl₄(indazole)₂]. *Inorg. Chem.*, **2008**, 47(14), 6513-6523.
- [42] Wang, F.; Bella, J.; Parkinson, J.A.; Sadler, P.J. Competitive reactions of a ruthenium arene anticancer complex with histidine, cytochrome c and an oligonucleotide. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2005**, 10(2), 147-155.
- [43] Egger, A.; Arion, V.B.; Reisner, E.; Cebrian-Losantos, B.; Shova, S.; Trettenhahn, G.; Keppler, B.K. Reactions of potent antitumor complex trans-[Ru(III)Cl₄(indazole)₂] with a DNA-relevant nucleobase and thioethers: insight into biological action. *Inorg. Chem.*, **2005**, 44(1), 122-132.
- [44] Heffeter, P.; Bock, K.; Atil, B.; Reza Hoda, M.A.; Korner, W.; Bartel, C.; Jungwirth, U.; Keppler, B.K.; Micksche, M.; Berger, W.; Koellensperger, G. Intracellular protein binding patterns of the anticancer ruthenium drugs KP1019 and KP1339. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2010**, 15(5), 737-748.
- [45] Clarke, M.J.; Zhu, F.; Frasca, D.R. Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals. *Chem. Rev.*, **1999**, 99(9), 2511-2534.
- [46] Kapitza, S.; Pongratz, M.; Jakupec, M.A.; Heffeter, P.; Berger, W.; Lackinger, L.; Keppler, B.K.; Marian, B. Heterocyclic complexes of ruthenium(III) induce apoptosis in colorectal carcinoma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **2005**, 131(2), 101-110.
- [47] Chen, T.; Liu, Y.; Zheng, W.J.; Liu, J.; Wong, Y.S. Ruthenium polypyridyl complexes that induce mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells. *Inorg. Chem.*, **2010**, 49(14), 6366-6368.
- [48] Kapitza, S.; Jakupec, M.A.; Uhl, M.; Keppler, B.K.; Marian, B. The heterocyclic ruthenium(III) complex KP1019 (FFC14A) causes DNA damage and oxidative stress in colorectal tumor cells. *Cancer Lett.*, **2005**, 226(2), 115-121.
- [49] Gossens, C.; Tavernelli, I.; Rothlisberger, U. Binding of organometallic ruthenium(II) anticancer compounds to nucleobases: a computational study. *J. Phys. Chem. A*, **2009**, 113(43), 11888-11897.
- [50] Fruhauf, S.; Zeller, W.J. New platinum, titanium, and ruthenium complexes with different patterns of DNA damage in rat ovarian tumor cells. *Cancer Res.*, **1991**, 51(11), 2943-2948.
- [51] Klajner, M.; Hebraud, P.; Sirlin, C.; Gaiddon, C.; Harlepp, S. DNA binding to an anticancer organo-ruthenium complex. *J. Phys. Chem. B*, **2010**, 114(44), 14041-14047.

- [52] Bruijninx, P.C.; Sadler, P.J. New trends for metal complexes with anticancer activity. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2008**, 12(2), 197-206.
- [53] Groessl, M.; Tsybin, Y.O.; Hartinger, C.G.; Keppler, B.K.; Dyson, P.J. Ruthenium versus platinum: interactions of anticancer metallodrugs with duplex oligonucleotides characterised by electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2010**, 15(5), 677-688.
- [54] Gao, F.; Chao, H.; Zhou, F.; Chen, X.; Wei, Y.F.; Ji, L.N. Synthesis, GC selective DNA binding and topoisomerase II inhibition activities of ruthenium(II) polypyridyl complex containing 11-aminopteridino[6,7-f][1,10]phenanthroline-13(12H)-one. *J. Inorg. Biochem.*, **2008**, 102(5-6), 1050-1059.
- [55] Liu, Y.J.; Zeng, C.H.; Yao, J.H.; Wu, F.H.; He, L.X.; Huang, H.L. Synthesis, structure, DNA-binding properties, and cytotoxicity of ruthenium(II) polypyridyl complexes. *Chem. Biodivers.*, **2010**, 7(7), 1770-1783.
- [56] Moucheron, C.; Kirsch-De Mesmaeker, A.; Kelly, J.M. Photoreactions of ruthenium(II) and osmium(II) complexes with deoxyribonucleic acid (DNA). *J. Photochem. Photobiol. B*, **1997**, 40(2), 91-106.
- [57] Liu, Y.J.; Chao, H.; Tan, L.F.; Yuan, Y.X.; Wei, W.; Ji, L.N. Interaction of polypyridyl ruthenium (II) complex containing asymmetric ligand with DNA. *J. Inorg. Biochem.*, **2005**, 99(2), 530-537.
- [58] Dougherty, T.J.; Gomer, C.J.; Henderson, B.W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q. Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, **1998**, 90(12), 889-905.
- [59] Benachour, A.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. In: *Brain cancer, targeting strategies and cervical cancer*; Elena K. Salavtti, Ed.; Nova Publisher, 2011; pp. 1-38.
- [60] Pernot, M.; Vanderesse, R.; Frochot, C.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. Stability of peptides and therapeutic success in cancer. *Expert Opin. Drug. Metab. Toxicol.*, **2011**, 7(7), 793-802.
- [61] Thomas, N.; Pernot, M.; Vanderesse, R.; Becuwe, P.; Kamarulzaman, E.; Da Silva, D.; Francois, A.; Frochot, C.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides with improved stability properties. *Biochem. Pharmacol.*, **2010**, 80(2), 226-235.
- [62] Thomas, N.; Tirand, L.; Chatelut, E.; Plenat, F.; Frochot, C.; Dodeller, M.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice. *Photochem. Photobiol. Sci.*, **2008**, 7(4), 433-441.
- [63] Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M.L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J. Control. Release*, **2006**, 111(1-2), 153-164.
- [64] Tirand, L.; Thomas, N.; Dodeller, M.; Dumas, D.; Frochot, C.; Maunit, B.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: an in vivo and in vitro study. *Drug Metab. Dispos.*, **2007**, 35(5), 806-813.
- [65] Schneider, R.; Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Gravier, J.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy. *Anticancer Agents Med. Chem.*, **2006**, 6(5), 469-488.

- [66] Schneider, R.; Schmitt, F.; Frochot, C.; Fort, Y.; Lourette, N.; Guillemin, F.; Muller, J.F.; Barberi-Heyob, M. Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy. *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, 13(8), 2799-2808.
- [67] Di Stasio, B.; Frochot, C.; Dumas, D.; Even, P.; Zwier, J.; Muller, A.; Didelon, J.; Guillemin, F.; Viriot, M.L.; Barberi-Heyob, M. The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. *Eur. J. Med. Chem.*, **2005**, 40(11), 1111-1122.
- [68] Schmitt, F.; Govindaswamy, P.; Zava, O.; Suss-Fink, G.; Juillerat-Jeanneret, L.; Therrien, B. Combined arene ruthenium porphyrins as chemotherapeutics and photosensitizers for cancer therapy. *J. Biol. Inorg. Chem.*, **2009**, 14(1), 101-109.
- [69] Schmitt, F.; Govindaswamy, P.; Suss-Fink, G.; Ang, W.H.; Dyson, P.J.; Juillerat-Jeanneret, L.; Therrien, B. Ruthenium porphyrin compounds for photodynamic therapy of cancer. *J. Med. Chem.*, **2008**, 51(6), 1811-1816.
- [70] Kim, Y.S.; Song, R.; Hyun Kim, D.; Jun, M.J.; Sohn, Y.S. Synthesis, biodistribution and antitumor activity of hematoporphyrin-platinum(II) conjugates. *Bioorg. Med. Chem.*, **2003**, 11(8), 1753-1760.
- [71] Lottner, C.; Knuechel, R.; Bernhardt, G.; Brunner, H. Combined chemotherapeutic and photodynamic treatment on human bladder cells by hematoporphyrin-platinum(II) conjugates. *Cancer Lett.*, **2004**, 203(2), 171-180.
- [72] Gilissen, M.J.; van de Merbel-de Wit, L.E.; Star, W.M.; Koster, J.F.; Sluiter, W. Effect of photodynamic therapy on the endothelium-dependent relaxation of isolated rat aortas. *Cancer Res.*, **1993**, 53(11), 2548-2552.
- [73] Carneiro, Z.A.; de Moraes, J.C.; Rodrigues, F.P.; de Lima, R.G.; Curti, C.; da Rocha, Z.N.; Paulo, M.; Bendhack, L.M.; Tedesco, A.C.; Formiga, A.L.; da Silva, R.S. Photocytotoxic activity of a nitrosyl phthalocyanine ruthenium complex--a system capable of producing nitric oxide and singlet oxygen. *J. Inorg. Biochem.*, **2011**, 105(8), 1035-1043.

II. Couplage de la porphyrine au ruthénium

Dans le but d'associer la phototoxicité de la PDT et la cytotoxicité des complexes de ruthénium, le Dr Frédéric Schmitt, en collaboration avec l'équipe du Dr Bruno Therrien à l'Université de Neuchâtel en Suisse, a synthétisé, caractérisé et étudié *in vitro* plusieurs conjugués porphyrine-Ru, porphyrine-osmium, porphyrine-iridium et porphyrine-rhodium [206-208]. En microscopie à fluorescence, les complexes porphyrine-Ru ont montré une accumulation cytoplasmique dans les cellules de mélanome humain Me300, les cellules du cancer du col de l'utérus HeLa et les cellules de carcinome ovarien A2780 et Ovar. Ces complexes n'ont pas été co-marqués avec le noyau, les lysosomes et les mitochondries. Aucune fragmentation nucléaire n'a été observée, suggérant l'absence d'apoptose cellulaire. Les complexes porphyrine-Ru étudiés par Schmitt *et al.* ont montré une cytotoxicité et une phototoxicité élevées dans différentes lignées cellulaires de cancer humain : Me300, HeLa, A 2780, Ovar [206-208].

Les complexes porphyrine-Ru mono- ou tétranucléaires couplés à la 4-pyridylporphyrine (4-pp) ou à la 3-pyridylporphyrine (3-pp) ont montré un intérêt particulier *in vitro* [207] (**Figure 24**).

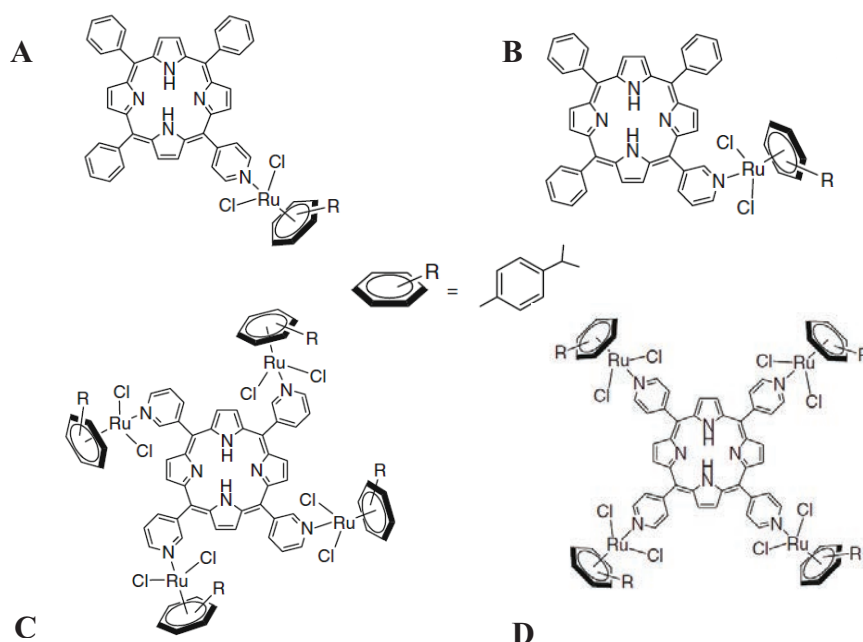


Figure 24 : Complexes porphyrine-Ru mono- ou tétranucléaires couplés à la 4-pyridylporphyrine (4-pp) ou à la 3-pyridylporphyrine (3-pp). Le groupement R représente l'arène *p*-cymène, de formule η^6 -*p*-PrⁱC₆H₄Me. **A**, Ru(η^6 -*p*-PrⁱC₆H₄Me)(5-(4-pyridyl)-10,15,20-triphenylporphyrin)Cl₂. **B**, Ru(η^6 -*p*-PrⁱC₆H₄Me)(5-(3-pyridyl)-10,15,20-triphenylporphyrin)Cl₂. **C**, Ru₄(η^6 -*p*-PrⁱC₆H₄Me)₄(5,10,15,20-tetra(3-pyridyl)porphyrin)Cl₈. **D**, Ru₄(η^6 -*p*-PrⁱC₆H₄Me)₄(5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrin)Cl₈.

La comparaison de leur efficacité photodynamique a permis de mettre en évidence une relation entre la structure des groupements pyridyl et l'activité phototoxique des complexes. Les composés possédant le complexe Ru en position 3-pp présentent une efficacité photodynamique nettement améliorée par comparaison à celle des composés dont le complexe Ru est situé en position 4-pp (**Tableau IV**). De plus, la présence de 4 complexes Ru sur le composé augmente son activité cytotoxique par rapport aux composés ne possédant qu'un complexe Ru.

Tableau IV : Efficacité photodynamique des différents complexes porphyrine-Ru étudiés par Schmitt F et al. [207].

Composés	DL ₅₀	IC ₅₀
Ru(η^6 - <i>p</i> -Pr ⁱ C ₆ H ₄ Me)(5-(4-pyridyl)-10,15,20-triphenylporphyrin)Cl ₂	10 J/cm ²	> 100 μ M
Ru(η^6 - <i>p</i> -Pr ⁱ C ₆ H ₄ Me)(5-(3-pyridyl)-10,15,20-triphenylporphyrin)Cl ₂	2,5 J/cm ²	> 100 μ M
Ru ₄ (η^6 - <i>p</i> -Pr ⁱ C ₆ H ₄ Me) ₄ (5,10,15,20-tetra(3-pyridyl)porphyrin)Cl ₈	< 0,5 J/cm ²	20 μ M
Ru ₄ (η^6 - <i>p</i> -Pr ⁱ C ₆ H ₄ Me) ₄ (5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrin)Cl ₈	6 J/cm ²	10 μ M

Abbréviations : DL₅₀, dose létale de lumière induisant 50 % de mort cellulaire ; IC₅₀, concentration nécessaire pour inhiber 50 % de la croissance cellulaire.

Une partie de mon travail de thèse a été consacré à l'étude *in vivo* des composés 3-pp [Ru(η^6 -*p*-PrⁱC₆H₄Me)(5-(3-pyridyl)-10,15,20-triphenylporphyrin) Cl₂, ou Rut1, et Ru₄(η^6 -*p*-PrⁱC₆H₄Me)₄(5,10,15,20-tetra(3-pyridyl)porphyrin) Cl₈, ou Rut4]. Les objectifs recherchés étaient :

- sélectionner le composé le plus efficace en PDT parmi Rut1 et Rut4 ;
- déterminer les conditions optimales de traitement pour le composé sélectionné ;
- valider l'efficacité anti-tumorale du composé sélectionné avec les conditions optimales de traitement.

1. Sélection du conjugué le plus efficace

Dans la publication expérimentale suivante, publiée dans *Journal of Photochemistry and Photobiology B*, nous décrivons l'étude menée *in vivo* sur un modèle de cellules de carcinome épidermoïde oral humain (KB) xénotransplantées en ectopique chez la souris *nude*. La particularité et l'originalité de cette approche expérimentale a été l'utilisation d'un plan d'expérience pour la sélection du composé efficace [4].

En effet, les modalités de traitement PDT *in vitro* ne peuvent pas être transposées aux modèles *in vivo* de tumeurs. *In vivo*, il existe une hétérogénéité spatiale des principaux acteurs de la PDT [209] : dose de photosensibilisateur, lumière et oxygène ; hétérogénéité que l'on ne retrouve pas *in vitro* du fait de la culture en monocouche des cellules. Les différents degrés de vascularisation des différentes zones de la tumeur induisent une répartition non homogène des photosensibilisateurs et de l'O₂. De plus, les propriétés optiques du tissu tumoral varient dans les différentes zones de la tumeur, ne permettant pas une pénétration homogène de la lumière dans le tissu tumoral. Ce phénomène est amplifié par la présence de fluorophores endogènes. Outre les variations spatiales, il existe également des variations temporelles des 3 acteurs durant le traitement. Les ERO générés peuvent détruire le photosensibilisateur (photoblanchiment), les dommages causés aux tissus induisent des variations de leurs propriétés optiques et la concentration en O₂ peut diminuer du fait de sa consommation photochimique et de la destruction des vaisseaux sanguins tumoraux. *In vivo*, les doses optimales de PDT dépendent donc d'une part du type tumoral et de la sensibilité intrinsèque des cellules de la tumeur et d'autre part des 3 facteurs impliqués en PDT. Cependant, ces facteurs interagissent ensemble, comme le traduit la formule mathématique de la dose photodynamique efficace :

$$\text{Dose photodynamique} = [\text{PS}] \times \varphi \times t \times \varepsilon \times [{}^3\text{O}_2] \times \Phi_{\Delta}({}^1\text{O}_2)$$

où, [PS] est la quantité de photosensibilisateur dans le tissu (mol/L), φ est l'irradiance lumineuse (W/cm²), t est le temps d'irradiation (s), ε est le coefficient d'extinction molaire du photosensibilisateur à la longueur d'onde d'irradiation (L/mol/cm), [O₂] est la concentration en oxygène moléculaire dans le tissu (mol/L) et $\Phi_{\Delta}({}^1\text{O}_2)$ est le rendement quantique de formation d'oxygène singulet. $\Phi \times t$ représente la fluence lumineuse (J/cm²).

Ces interactions rendent la détermination des conditions optimales de PDT non linéaires et multivariées, ne permettant pas d'appliquer une simple escalade de doses. Ainsi, plusieurs méthodes peuvent être employées pour optimiser les paramètres nécessaires au traitement :

- Tester l'effet de toutes les combinaisons possibles de paramètre sur la réponse tumorale. Cependant, cette méthode est chronophage et coûteuse en animaux ;
- Faire varier les valeurs d'un seul paramètre et fixer les valeurs des autres paramètres (approche « un facteur à la fois »). Cependant, cette méthode ne tient pas compte des interactions entre les différents paramètres lors du traitement ;
- Appliquer la méthodologie de plan d'expérience [210-212]. Il s'agit d'une méthode mathématique et empirique qui explore l'impact des différents paramètres et leurs interactions sur la réponse tumorale. Elle permet de faire varier les paramètres simultanément et de réduire le nombre d'animaux utilisés.

Les plans d'expériences sont bien connus des chercheurs dans les domaines de l'agroalimentaire, de la chimie et des thérapies anti-cancéreuses autres que la PDT [213].

Pour réaliser une PDT, 4 paramètres doivent être étudiés et optimisés :

- la dose de photosensibilisateur administrée, en mg/kg, qui influe sur la biodistribution tumorale du photosensibilisateur ;
- l'IDL, en heure, qui représente l'intervalle de temps entre l'administration du photosensibilisateur et le début de la phase d'irradiation et détermine ainsi la répartition du photosensibilisateur entre les cellules tumorales, les cellules saines et les vaisseaux sanguins ;
- la fluence lumineuse, en J/cm^2 , qui traduit la densité surfacique de lumière (photons) apportée au cours du traitement ;
- l'irradiance lumineuse, en mW/cm^2 , qui représente la densité de puissance du rayon appliqué à la zone à traiter.

En plus de ces 4 paramètres, nous avons introduit dans notre étude deux autres facteurs permettant de tester les effets additifs du ruthénium et ceux de la structure du complexe (mono- ou tétranucléaires). Nous avons réalisé un plan d'expérience dit de « screening » des six facteurs pour évaluer l'importance et l'impact de chacun dans la réponse tumorale. Le modèle mathématique utilisé a permis d'estimer les effets additifs des 6 facteurs étudiés sur la réponse tumorale, c'est à dire sur le taux de croissance du diamètre tumorale

(IDGR, Intrinsic Diameter Growth Rate), exprimé en mm/jour [210]. L'IDGR est une nouvelle expression statistique de la croissance tumorale, utilisée comme variable de réponse dans les plans d'expérience [210, 211]. Il est déterminé mathématiquement à partir des valeurs des volumes tumoraux par le logiciel Matlab[®]. L'IDGR apporte des informations sur la cinétique de croissance tumorale. Son analyse est plus simple que celui du volume tumoral et surtout il représente une variance plus faible que la statistique classique (TGD) fondée sur le volume tumoral (**Figure 25**).

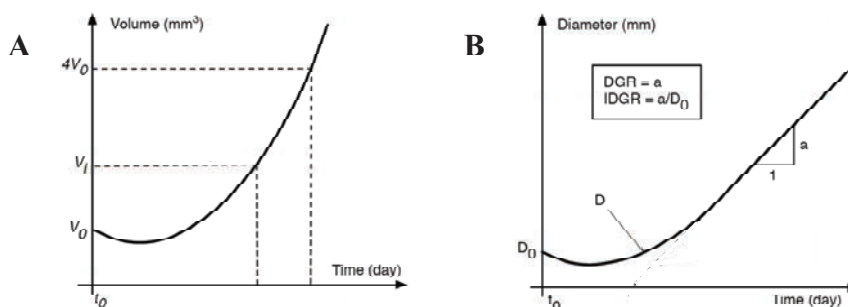


Figure 25 : Représentations graphiques de suivi de croissance tumorale. **A**, volume en $\text{mm}^3 = f(\text{temps en jours})$ montre l'évolution non linéaire du volume au cours du temps. **B**, diamètre en $\text{mm} = f(\text{temps en jours})$ montre l'évolution linéaire du diamètre au cours du temps. L'IDGR est calculé à partir de la pente (a) de la partie linéaire de la courbe divisée par le diamètre initial.

Dans notre étude, le plan d'expérience a mis en évidence l'importance d'une part du composé Rut4 et d'autre part de l'IDL 24h sur l'efficacité anti-tumorale en PDT. Des études de biodistribution non invasives par spectrofluorimétrie fibrée ainsi que des approches pharmacocinétiques invasives ont été réalisées sur notre modèle de tumeur chez la souris *nude*. La distribution tumorale de Rut4 est maximale de 24h à 96h et diminue considérablement deux semaines après l'injection par voie i.v. du composé. Au contraire, la distribution tumorale de Rut1 apparaît comme plus lente et atteint son maximum 48h après l'injection par voie i.v. du composé. Le temps de demi-vie plasmatique de Rut4 est de 58h. En effet, le ruthénium est largement retrouvé dans les organes du SRE dès 3h après l'injection par voie i.v. En revanche, Rut4 ne traverse pas la BHE. Des études de colocalisation nucléaire ont été réalisées par microscopie à épifluorescence sur les cellules KB et n'ont pas confirmé le ciblage nucléaire ni de Rut1, ni de Rut4. Les images de microscopie ont toutefois montré une accumulation cytoplasmique des deux composés, par comparaison au photosensibilisateur seul, avec une intensité de fluorescence similaire pour les deux conjugués. Ce travail original illustre l'intérêt de l'utilisation d'une méthodologie de plan d'expérience pour l'optimisation de condition de traitement présentant de nombreux facteurs interagissant entre eux.

Systems Biology Approach for *in vivo* Photodynamic Therapy Optimization of Ruthenium-Porphyrin Compounds

Marlène Pernot,^{a, b} Thierry Bastogne,^{a, b, c, h} Nicolas P. E. Barry,^d Bruno Therrien,^d Gunda Koellensperger,^e Stephan Hann,^e Vadzim Reshetov,^{a, b, f} and Muriel Barberi-Heyob,^{a, b, g, h, *}

^a Université de Lorraine, CRAN, UMR 7039, Campus Sciences, BP 70239, Vandœuvre-lès-Nancy Cedex, 54506, France

^b CNRS, CRAN, UMR 7039, France

^c INRIA, BIGS, France

^d Institute of Chemistry, University of Neuchatel, Ave de Bellevaux 51, CH-2000 Neuchatel, Switzerland

^e BOKU, University of Natural Resources and Life Sciences, Department of Chemistry Division of Analytical Chemistry, Muthgasse 18, A-1190 Vienna, Austria

^f Laboratory of Biophysics and Biotechnology, Belarusian State University, pr-t Nezavisimosti 4, Minsk, 220030, Belarus

^g Centre Alexis Vautrin, CRLCC, avenue de Bourgogne, Vandœuvre-lès-Nancy, 54511, France

^h GDR CNRS 3049 "Médicaments Photoactivables-Photochimiothérapie (PHOTOMED)"

* Corresponding author. Address: Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), Université de Lorraine, CNRS, Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne, Brabois, F-54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France. Phone: + 33 3 83 59 83 76, Fax: + 33 3 83 59 83 78, E-mail address: m.barberi@nancy.unicancer.fr

Abbreviations

DLI, drug-light interval; NMR, nuclear magnetic resonance; IDGR, intrinsic diameter growth rate; ICP-MS, inductively coupled plasma mass spectrometry; C, concentration; FR, fluence rate; F, fluence; Φ , quantique field; pp, phenylporphyrin; Rut, ruthenium; PMP, mono-3-pp; PTP, tetra-3-pp; $\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-Pr}^i\text{C}_6\text{H}_4\text{Me})(\text{PMP})\text{Cl}_2$, Rut1; $\text{Ru}_4(\eta^6\text{-}p\text{-Pr}^i\text{C}_6\text{H}_4\text{Me})_4(\text{PTP})\text{Cl}_8$, Rut4; $^1\text{O}_2$, singlet oxygen; TPP, tetraphenylporphyrin; DAPI, 4',6'-diamino-2-phenylindolylhydrochloride; NAMI-A, *trans*- $\text{RuCl}_4(1H\text{-imidazole})(\text{dimethyl sulfoxide-}S)$; KP1019, *trans*- $\text{RuCl}_4(1H\text{-indazole})_2$; MRT, mean residence time; K_{el} , elimination constant; $T_{1/2}$, half-life.

Abstract

Two arene ruthenium porphyrin compounds showing interesting photodynamic activity *in vitro*, $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-Pr}^i\text{C}_6\text{H}_4\text{Me})(\text{PMP})\text{Cl}_2]$ (PMP=5-(3-pyridyl)-10,15,20-triphenylporphyrin) and $[\text{Ru}_4(\eta^6\text{-}p\text{-Pr}^i\text{C}_6\text{H}_4\text{Me})_4(\text{PTP})\text{Cl}_8]$ (PTP=5,10,15,20-tetra(3-pyridyl)porphyrin) coined Rut1 and Rut4 respectively, have been evaluated *in vivo*. Porphyrins alone and the arene ruthenium porphyrin derivatives (Rut1 and Rut4) showed comparable spectroscopic and photophysical properties. The *in vivo* study consisted in selecting the optimal arene ruthenium porphyrin photosensitizer by using an original experimental design approach on mice bearing an ectopic human oral carcinoma xenograft. The model of experimental design demonstrated to be well suited to the empirical model-building of photodynamic therapy (PDT) response. Arene ruthenium porphyrins concentration and fluence level demonstrated no statistically significant influence on the tumor growth. On the contrary, the presence of ruthenium groups improved the *in vivo* photodynamic efficiency. By optical fiber fluorimetry, we demonstrated that both compounds exhibited enhanced accumulation in KB tumors from 24 h to 96 h post-intravenous injection. These experiments were completed by inductively coupled plasma mass spectrometry quantification of ruthenium in different organs including tumor tissue. Despite a statistically significant *in vivo* photodynamic efficiency for Rut4, cellular localization in human oral carcinoma KB cells using fluorescence microscopy demonstrated that both conjugates Rut1 and Rut4 accumulated only in cytoplasm of KB cells but not in the nucleus.

Keywords: Combined phototherapy, Ruthenium, Porphyrin, Human oral carcinoma-bearing nude mice, Experimental design approach.

1. Introduction

The targeted delivery of photosensitizers to defined cells is a major problem in photodynamic therapy (PDT), and one area of importance is photosensitizer targeting. In this sense, an arsenal of targeting approaches has been described in the literature [1]. In this view, photosensitizers can be covalently bound to different biomolecules such as sugars, steroid hormones, amino acids, proteins *via* a direct coupling or using linkers/spacers.

To improve their cellular uptake and photocytotoxicities, photosensitizers can also be coupled to chemotherapeutic agents. Photosensitizers coordinated to platinum derivatives such as cisplatin or oxaliplatin were designed and tested *in vitro* to promote global cytotoxic effects [2-4]. These complexes indeed aim to combine the cytotoxicity of platinum with the photodynamic activity of porphyrins, leading to an additive genotoxic effect to PDT [2, 3, 5, 6]. Platinum-based drugs are among the most active anticancer agents [7]. However, cisplatin clinical usefulness has frequently been limited by severe adverse effects, such as nephrotoxicity, gastrointestinal toxicity and ototoxicity. Oxaliplatin, another platinum-based drug, has consistently demonstrated antitumor efficiency *in vitro* with acquired cisplatin resistance cells and appears to be also active in tumor types that are intrinsically resistant to cisplatin and carboplatin [7]. However, the limitation of oxaliplatin-based treatments is mainly the neurotoxicity [8]. Using other metal-based compounds is very appealing to overcome the drawbacks associated with cisplatin and/or oxaliplatin [9, 10]. This motivated us to develop new compounds using a less cytotoxic metal conjugated to a photosensitizer [11-14]. Ruthenium appears to be an attractive alternative to platinum, since ruthenium compounds are known to display less general cytotoxicity than their platinum counterparts [15], and are also able to interact with DNA and proteins [10]. Conjugation of ruthenium to a photosensitizer could be suggested to improve the cellular uptake and the DNA localization of the photosensitizer, thanks to the specific transport of ruthenium to tumor cells by transferrin [16] and the DNA binding properties of ruthenium compounds [17]. Schmitt *et al.* have improved cellular uptake of porphyrin by conjugation with ruthenium compounds [11]. Ruthenium-based drugs display reduced side effects than platinum derivatives [11, 18]. Using diruthenium tetracarbonyl structure as the organometallic agent and backbone of the complexes, our group also demonstrated that these organometallic porphyrin complexes exhibited photocytotoxicities *in vitro* in several human cancer cell lines: HeLa cervix, A2780 and Ovarian, A549 pulmonary, Me300 melanoma, PC3 and LnCap prostate, KB head and neck, MCF7 and MDA-MB231 breast or HT29 colon cancer cells [19]. To combine the

cytotoxicity of ruthenium with the photodynamic efficiency of porphyrin, a series of mononuclear and tetranuclear arene ruthenium porphyrin complexes has been recently prepared [12]. Two derivatives, the mononuclear complex $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-Pr}^i\text{C}_6\text{H}_4\text{Me})(\text{PMP})\text{Cl}_2]$ (PMP=5-(3-pyridyl)-10,15,20-triphenylporphyrin) (Rut1) and the tetranuclear complex $[\text{Ru}_4(\eta^6\text{-}p\text{-Pr}^i\text{C}_6\text{H}_4\text{Me})_4(\text{PTP})\text{Cl}_8]$ (PTP=5,10,15,20-tetra(3-pyridyl)porphyrin) (Rut4) (see Figure 1), revealed a photodynamic efficiency *in vitro* on Me300 human melanoma cells [12]. However, PDT is as effective as conventional therapies for the treatment of early squamous cell cancers of the head and neck; Of 518 patients treated with Cis, T1, or T2 cancers of the oral cavity, larynx, pharynx, and nasopharynx, 462 (89.1%) obtained a complete clinical response after one PDT treatment [20]. KB cell line being a human squamous cell carcinoma cell line (human oropharyngeal cancer cell line) *in vivo* testing was required to confirm the real potential of using arene ruthenium porphyrin photosensitizers as PDT agents for head and neck cancer. However, PDT modalities applied *in vitro* cannot be easily adapted and transposed *in vivo*.

The research question addressed in this paper deals with the optimization of the *in vivo* PDT modalities with newly-developed photosensitizing agents. The optimization of PDT modalities *in vivo* must take into account numerous *phenomena*, regarding one or several of the three main factors involved (*i.e.* photosensitizer concentration in the tumor tissue, light and oxygen). Moreover, photosensitizer concentration within the tumor displays spatial heterogeneity (*i.e.* center *vs.* periphery, vasculature *vs.* tumor cells). Light penetration through tissues depends on their specific optical properties and molecular oxygen concentration is heterogeneous within the tumor, due to differences in vascularization and oxygen supply. To complicate matters further, all these factors can also vary during PDT. In this context, the optimal PDT dose required is dependent on the cancer type and the intrinsic sensitivity of targeted cells. These difficulties make the determination of the *in vivo* PDT modalities a nonlinear and multivariable optimization problem, and a successful dosimetry strategy has to take into consideration these particular aspects of the problem. In practice, the four factors that are usually considered are the administrated photosensitizer dose, the time interval between photosensitizer administration and light irradiation usually called drug-light interval (DLI), the fluence and the fluence rate. The determination of the optimal PDT dosimetry can be expressed as the optimal choice of these four factors. A first method would be to test all the factor combinations, which would require a large number of animals and be very time-consuming. Another method would be a step-by-step approach, wherein each factor is varied while the other ones are fixed to an arbitrary value. Nevertheless, because of the interactions

between factors, this method can provide biased results. In this study, the main aim was to determine which one of the two arene ruthenium porphyrin complexes (Rut1 or Rut4) led to the best *in vivo* photodynamic activity on nude mice xenografted ectopically with a human head and neck carcinoma cell line human model. In addition, biodistribution and pharmacokinetic studies have been performed by two complementary approaches, either by a non-invasive technique with a fiber spectrofluorimeter corresponding to the porphyrin levels or by quantification via inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), corresponding to the ruthenium levels in plasma and tumor. The optical fiber spectrofluorimeter was used to follow the fluorescence accumulation of the mononuclear complex by fluorescence spectroscopy in real-time in tumors-bearing nude mice.

Fluorescence microscopy experiments were also undertaken to visualize and to compare intracellular uptake and nuclei localization between Rut1 and Rut4.

2. Experimental

2.1. Photosensitizer

Photosensitizers $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-Pr}^i\text{C}_6\text{H}_4\text{Me})(\text{PMP})\text{Cl}_2]$ (PMP = 5-(3-pyridyl)-10,15,20-triphenylporphyrin) and $[\text{Ru}_4(\eta^6\text{-}p\text{-Pr}^i\text{C}_6\text{H}_4\text{Me})_4(\text{PTP})\text{Cl}_8]$ (PTP = 5,10,15,20-tetra(3-pyridyl)porphyrin) called Rut1 and Rut4, were synthesized and purified as described previously [12].

2.2. Photophysical Studies

Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer (Lambda 2, Courtaboeuf, France) UV-visible spectrophotometer. Fluorescence data were recorded on a Fluorolog-3 spectrofluorimeter F222 (Jobin Yvon, Longjumeau, France) equipped with a thermostatted cell compartment (25°C) using a 450 W xenon lamp. The ΦF values were determined by the equation: $\Phi\text{F}(\text{sample}) = (F_{\text{sample}}/F_{\text{ref}})(A_{\text{ref}}/A_{\text{sample}})(n_{\text{sample}}^2/n_{\text{ref}}^2)\Phi\text{F}(\text{ref})$, where F , A , and n are the measured fluorescence (area under the emission peak), the absorbance at the excitation wavelength, and the refractive index of the solvent, respectively. Tetraphenylporphyrin (TPP) in toluene was used as reference compound [$\Phi\text{f}(\text{ref}) = 0.11$] [21]. Determination of singlet oxygen quantum yield $\Phi(^1\text{O}_2)$: Excitation occurred with a Xe-arc, the light was separated in a Fluorolog-3 spectrofluorimeter F222, 0.22 μm double

monochromator. The detection at 1270 nm was done through a PTI S/N 1565 monochromator, and the emission was monitored by a liquid nitrogen-cooled Ge-detector model (EO-817L, North Coast Scientific Co).

2.3. *Animals and Tumor Model*

Female no consanguine nude mice (nu/nu) were used for this study (Janvier, St Berthevin, France). Animal care and studies were performed in accordance with the European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes, EU directives, and the statutory law on animal experiments in France. Mice (6 to 7/cage) were maintained in standard cages in isolators. Animals were housed 12-hour/dark cycles at 22 to 24°C and 50% humidity and were given food and water *ad libitum*. The mice were used for tumor implantation when they were 7 to 9 weeks old (20-25 g). The model of human oral carcinoma was obtained using KB cells, as described previously for the first experimental design [21].

2.4. *PDT treatment of tumors*

All compounds were dissolved in polyethylene glycol (PEG) 400-ethanol-water (30/20/50, v/v/v), at the dose indicated by the experimental matrix. The different doses were injected into the mice *via* the tail vein. Irradiation of tumors was carried out at 514 nm, using an argon laser (model 375B; Spectra-Physics, Les Ulis, France). Light was delivered through an optical fiber (HCG type; SEDI Fibres Optiques, Courcouronnes, France) and a light distributor (Frontal Diffuser FDI; Medlight SA, Ecublens, Switzerland) which provided a perfectly homogeneous illumination of the spot and illuminated the tumor surface over a 2-cm-diameter beam spot. The incident fluence rate on the tumors was evaluated using an optical power meter (model SP407; SpectraPhysics). Following PDT, tumor volume (V) was calculated using the formula:

$$V = (\text{length} \times \text{width}^2)/2$$

Measurements were carried out over 2 months or until tumors reached a size of 1 cm³, at which time mice were sacrificed by cervical dislocation.

2.5. Fiber spectrofluorimeter

Rut1 and Rut4 compounds at the concentrations of 1.75 $\mu\text{mol/kg}$ (according to the values of the experimental design) were injected into mice *via* the tail vein when the tumors reached 60 mm^3 . The optical fiber was held on the tumors in direct contact with the skin. The measurements were performed at 3, 24, 48 and 96 hours after Rut4 or Rut1 injection. Fluorescence measurements of mice were performed with an optical fiber spectrofluorimeter built in our laboratory. The excitation source used was a laser module (Laser 2000, λ_{exc} 410 nm, $\Delta\lambda$ 3 nm) and an output power of 300 μW . The optical probe was an optical fiber bundle composed of three fibers, one (550 μm core) for excitation light delivery, one (200 μm core) for fluorescence, and one for the backscattered light collection. A long pass filter (Oriol 455FG 03-25) with a 97% transmittance at 500 nm was used on the emission path. The spectrometer used (USB 2000-Ocean Optics) was connected to a computer and a dedicated software. For fluorescence measurements, the distal end of the probe was placed in gentle contact with the tissue area. To evaluate measurement variations, three spectra were performed per site with an accumulation time of 0.5-1 s and then averaged. The three sites were analyzed for each tissue. Standard errors (S.E.) were only calculated for intra tissue variations. Three animals for each condition were tested.

2.6. Biodistribution

When tumors reached a volume of 60 mm^3 , Ru4 (1.8 $\mu\text{mol/kg}$) dissolved in PEG 400-ethanol-water (30/20/50, v/v/v) was injected into mice *via* the tail vein. The mice were subsequently kept in the dark. After 3, 24, 48 and 96 hours, 1 and 2 weeks mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (Ketalar[®], Panpharma, Fougères, France) at 60 mg/kg and xylazine (Rompun[®], Bayer Pharma, Puteaux, France) at 80 mg/kg. Blood samples were collected in heparinized tubes by cardiac puncture, and centrifuged at 1500 g for 15 min at 4°C. Mice were sacrificed by cervical dislocation and the tumor and organs (skin, muscle, liver, kidneys, spleen and brain) were carefully excised, rinsed with saline buffer and blotted dry. At least three animals were used per time point. All samples were protected from light. Plasma, tumor and organs samples were weighted and kept at -80°C in polypropylene tubes, until ICP-MS analysis.

2.7. Inductively coupled plasma-mass spectrometry of ruthenium in tissue and plasma samples after microwave digestion.

Tissue samples were cut with the aid of a ceramic knife. Approx. 20 mg of sample were weighed into pre-cleaned glass vials. Then 0.3 mL ultrapure double sub-boiled HNO₃ conc. and 0.1 mL ultrapure H₂O₂ (VWR) were added. After 5 minutes reaction time 0.05 mL ultrapure sub-boiled HCl conc. was added, the vessels were closed and digested employing closed vessel microwave digestion (Microwave 3000, Anton Paar) with Rotor 64MG5 (64 positions) applying the digestion program as follows: 1400 W/15 minutes (2 minutes ramp), 1200 W/15 minutes, 0 W/15 minutes. After the digestion the samples were quantitatively transferred into a pre-cleaned polyethylene tube and filled to approximately 5 g using ultrapure sub-boiled water. The solutions were stored at 4°C until measurement. Ruthenium analysis was carried out at m/z 101 on an Elan 6100 DRC II ICP-MS (Perkin-Elmer-Sciex, Ontario, Canada) combined with a PFA-ST microflow nebulizer (ESI, Omaha, NE, USA) and a cyclonic spray chamber (PE Sciex). Quantification was performed with external calibration (internal standardization with Indium) in a working range of 0.1 to 20.0 µg.L⁻¹. The limit of detection of Ru (µg kg⁻¹ wet weight) was 1 and 0.3 for the first and second sample set, respectively.

2.8. Visualization of cytoplasm localization by epifluorescence microscopy

Exponentially growing KB were plated at 10³ cells per well in Labtek-II® 1-chambered coverslips (Dutscher, Brumath, France). After a 48-h attachment and growth period at 37°C, the cells were incubated with Rut1 or Rut4 compounds (10 µM) for 24 h in the dark. Nuclei were stained with 4',6'-diamino-2-phenylindolylhydrochloride (DAPI; 0.25 mg/L, Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) in phosphate-buffered saline. After washing, fluorescence microscopy was performed with an upright epifluorescence microscope (AX70 Provis, Olympus, Rungis, France), equipped with a 100 W mercury vapor lamp. Rut1 and Rut4 were observed using a filter set consisting of a 460-490 nm band pass excitation filter, associated with a 505 nm dichroic mirror and a 510-550 nm band pass emission filter. Nuclei were observed using a filter set consisting of a 330-385 nm band pass excitation filter, associated with a 400 nm dichroic mirror and a 420-460 nm band pass emission filter. Neutral density filters were used in order to reduce photobleaching phenomenon. Fluorescence images were recorded using a x100 immersion objective during a strictly controlled integration time.

The same conditions (light intensity, objective, integration time) were used for both conjugates, to allow comparison.

2.9. Design of Experiments for selecting active factors

The mathematical model used to estimate the factor effects on the IDGR (intrinsic diameter growth rate) response [22] is

$$Y = b_0 + b_{1A} * (X_{1A}) + b_{2A} * (X_{2A}) + b_{3A} * (X_{3A}) + b_{4A} * (X_{4A}) + b_{5A} * (X_{5A}) + b_{6A} * (X_{6A}) + b_{6B} * (X_{6B}) + E$$

where Y is the response variable (IDGR), X_{iA} denotes the A-level of the i^{th} factor and E is a centered Gaussian random variable describing the experimental repeatability. b_{iA} is a model coefficient that quantifies the effect on the response of the factor X_i when it switches from level 'ref' to A. b_0 corresponds the reference response, *i.e.* the mean response when the factors take their reference level. The estimation of the model coefficients and their statistical significance were supported by an analysis of variance (ANOVA) and Student's t-tests computed by the Nemrod-W® software. The level of significance was set to $p < 0.05$.

In Bastogne *et al.*, [23], a new statistical model of tumor growth was suggested to improve the robustness and accuracy of the therapeutic effect evaluation. In *in vivo* growth inhibition studies, the most commonly used characteristics of tumor growth are tumor growth delay (TGD) and tumor volume T/C value [24]. TGD and T/C are both based on a local event, either the time instant associated with the quadrupling of the tumor volume or the relative tumor volume at a given time point after treatment, respectively. Accordingly, these two characteristics only give quantitative information about the tumor growth at an event point but provide no information about the global behavior of the tumor after this event. We have shown the linearity of tumor responses when the analyzed response is the equivalent volume diameter instead of the tumor volume [23]. The equivalent volume diameter corresponds to the diameter of a fictitious spherical tumor whose volume is equal to the measured volume of the real (non-spherical) tumor. From these results, they have proposed in [22] a new tumor growth statistics: IDGR which characterizes the steady-state effects of anti-cancer treatments. This statistics is the ratio of the diameter growth rate (slope of the tumor diameter response [mm/day]) with the spherical equivalent diameter [mm] at the treatment beginning.

3. Results

3.1. Spectroscopic characterization and photophysical properties

The synthesis of $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-Pr}^i\text{C}_6\text{H}_4\text{Me})(\text{PMP})\text{Cl}_2]$ and $[\text{Ru}_4(\eta^6\text{-}p\text{-Pr}^i\text{C}_6\text{H}_4\text{Me})_4(\text{PTP})\text{Cl}_8]$, Rut1 and Rut4 (Fig. 1A), respectively has been previously described [12]. In addition to the mononuclear and tetranuclear arene ruthenium complexes, the arene ruthenium complex without a porphyrinic ligand $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-Pr}^i\text{C}_6\text{H}_4\text{Me})(\text{pyridine})\text{Cl}_2]$ [24], as well as the non-coordinated porphyrins (PMP) and (PTP) have been used as controls. The absorption spectra of all porphyrinic compounds show the characteristic Soret and Q-bands (Fig. 1B). Moreover, these four compounds displayed a low fluorescence quantum yield and a much higher singlet oxygen quantum yield (Fig. 1C). Conjugation to ruthenium units in complexes Rut1 and Rut4 did not induce significant variations in fluorescence and singlet oxygen quantum yields of the porphyrin ligands. However, a low decrease in singlet oxygen quantum yield value was observed (0.71 *versus* 0.57) when PTP is coordinated to four arene ruthenium units.

3.2. Design of Experiments

The main goal was to test additive and/or synergistic effects of six biological factors on the treatment response, noted Y, that corresponds to the to the intrinsic diameter growth rate (IDGR) precisely defined in the literature [22]. The six factors to be tested are noted X1 to X6 and are presented in Table 1. Each factor can take two values, denoted by the symbols (-) and (+) (Tables 2 and 3), that were selected according to treatment modalities. As previously validated for another conjugated-photosensitizer [22], limits of the experimental domain concerning light doses to be explored were defined as follows: fluence rate $\in [50\text{-}125]$ mW/cm², Fluence $\in [10\text{-}150]$ J/cm². The ranges of fluence and fluence rate values were selected according to the literature and photosensitizer doses were chosen in a range commonly used with other photosensitizers from 0.44 to 1.75 $\mu\text{mol/kg}$ [25-27]. According to the values of X5 and X6, four different therapeutic compounds were tested on mice bearing an ectopic human oral carcinoma xenograft. Table 3 presents the complete experimental design composed of 12 treatments repeated six times each, and the mean IDGR values for each modality. Optimizing PDT responses consisted in minimizing IDGR values. As

illustrated by treatment modality number 9, minimizing IDGR values required selecting a low Rut4 concentration associated with a high DLI (Table 3). The mathematical model used to estimate additive and synergistic effects is defined in Table 2 and each effect is measured by a coefficient in the model and the estimated values of these coefficients are given in Table 4. These results show the lack of synergistic effects between factors (X1;X2), (X2;X4) and (X5;X6) but it emphasizes significant (significance level: $p < 0.1$) additive effects of four factors: X1, X3, X5 and X6 as illustrated in Figure 2 in which each bar corresponds to the value of the associated effect on the IDGR. If the latter is negative, it leads to a decrease of IDGR value and an increase if it is positive. The red bar associated with the model coefficient b1 shows that the most suited value for DLI is 24 h. It is also shown that a reduced value of fluence rate (50 mW/cm^2) leads to a more efficient photodynamic efficiency (Fig. 2). Results also stress that the chosen values of the photosensitizer concentration (X2) and the fluence level (X4) have no statistically significant influence on IDGR values. Mainly, coefficients b5 and b6 indicate a significant influence of the presence of ruthenium groups and PTP on the IDGR decrease, resulting in Rut4 compound. For the 12 treatment modalities, time-dependent tumor growth curves were represented (Fig. 3a), completed by a Kaplan-Meier curve corresponding to the three experimental conditions using Rut4 and considering the percentage of tumors not having reached 7 times their initial volume at the end point. The results argue that conditions of experiment number 9 (DLI 24 h, $0.44 \mu\text{mol Rut4/kg}$, fluence rate 50 mW/cm^2 and fluence 10 J/cm^2) lead to a tumor growth stabilization until 30 days and more.

3.3. *In vivo* biodistribution

An optical fiber spectrofluorimeter was used to follow the fluorescence accumulation of the compounds by fluorescence spectroscopy in real-time in tumor-bearing nude mice. Bourdon *et al.* have demonstrated that *in situ* fluorescence measurements with an optical fiber fluorimetry system and concentration data determined by HPLC after extraction were in broad agreement, indicating that this noninvasive technique is sufficiently sensitive and can be used to follow the distribution of fluorescent drugs [28]. Fluorescence emission spectra were also recorded in normal epithelial tissue (skin) on healthy paw for each mouse using the same conditions. Spectra were normalized relative to the tissue autofluorescence. Each spectrum was a mean fluorescence spectrum calculated from three spectra measured at different points of the tissue (data not shown). The box plots show a highest fluorescence level into tumor tissue 48 h and 24 h after intra-venous injection for Rut1 and Rut4, respectively (Fig. 4).

Interestingly, for Rut4 compound, 96 h after intravenous injection, we measured approximately 2-fold lower fluorescence intensity than at 24 h. However, at that late time, fluorescence accumulation data are not dispersed.

In order to explore Rut4 biodistribution in healthy tissues, the concentration of ruthenium was determined *via* ICP-MS at m/z 101 into different organs (brain, skin, muscle, liver, kidney and spleen) from at least three mice at six different times. Following intravenous injection, the study shows an accumulation of Rut4 in the highly perfused tissues such as liver, spleen and kidney, which accumulate higher levels of Rut4 than the peripheral tissues such as skin and muscle (Fig. 5). As expected, ruthenium concentrations in tumor were the highest from 24 h to 96 h and significantly decreased until 2 weeks. Ruthenium rates in liver, kidney and spleen were higher than in tumor, probably due to the reticuloendothelial system elimination. No ruthenium concentration was obtained in brain, indicating that Rut4 compound do not cross the blood-brain barrier. Using a noncompartmental analysis, plasma pharmacokinetic parameters validated a relatively slow elimination from the blood compartment (Fig. 5). Moreover, Rut4 accumulated at high levels in the tumor, with 1.4% and 1.5% of the injected dose per gram of tumor tissue at 24 h and 48 h after injection, respectively. Then, tumor levels of Rut4 appeared to decline steadily from 96 h to 336 h (Fig. 5).

3.4. Intracellular localization

Because an enhanced accumulation of the compounds could reflect intracellular uptake but also binding to the membrane without internalization, fluorescence microscopy experiments were undertaken to visualize intracellular uptake and nuclei localization. Nuclei localization in KB cells following incubation with Rut1 or Rut4 derivatives (10 μ M, 24 h) was studied using DAPI by epifluorescence microscopy. The cells exhibit very intense and diffuse intracellular fluorescence following incubation with both conjugates used at the same molar concentration (Fig. 6). This fluorescence emission appeared restricted to the cytoplasmic compartment with no detectable nuclear staining.

4. Discussion

To improve the cellular uptake of photosensitizers and their photocytotoxicity, they can be coupled to chemotherapeutic agents. Photosensitizers coordinated to ruthenium moieties have been tested *in vitro* [6, 11, 12]. These complexes indeed aim to (i) combine the cytotoxicity of ruthenium with the photodynamic activity of photosensitizers, (ii) improve tumor selectivity and cellular uptake of photosensitizers thanks to the specific transport of ruthenium to tumor cells by transferrin, (iii) increase hydrophilicity of photosensitizers according to ruthenium ligands, and (iiii) combine activation of photosensitizer and ruthenium-induced photocleavage of DNA by irradiation of the tumor. In this purpose, our group have coordinated arene ruthenium moieties to pyridylporphyrins and showed that ruthenium(II) organometallic complexes remained intact following their uptake by cells [11, 12]. Then, we synthesized and studied *in vivo* arene ruthenium porphyrin compounds containing either one (Rut1) or four (Rut4) arene ruthenium units coordinated to 3-pyridylporphyrin photosensitizer derivatives (PMP and PTP, respectively). All photoactivatable compounds presented comparable spectroscopic properties. The electron-withdrawing character of the pyridyl groups in the 3-pyridylporphyrin derivatives was higher than those previously described in the 4-pyridylporphyrin analogues [12]. Previous studies have demonstrated that the nature of the pyridylporphyrin isomer (3-pyridyl *versus* 4-pyridyl) was more important than the degree of substitution of the tetrapyrrole ring, thus with similar spectroscopic properties, 3-pyridyl photosensitizers showed a better photodynamic efficiency *in vitro* than 4-pyridyl photosensitizers at an equivalent degree of substitution [12].

This *in vivo* study consisted in selecting the optimal arene ruthenium porphyrin photosensitizer by using an original experimental design approach on mice bearing an ectopic human oral carcinoma xenograft. As opposed to chemotherapy, where the main factor to be determined is the drug dose, by a classical dose escalation methodology, PDT is not only linked to a molecule but is a complex technique wherein several factors (photoactive compound, light dose and oxygen) interact with each other's. In this case, the statistical design of experiments is a relevant modeling methodology able to significantly reduce the experimental cost by a rational selection of the most appropriate experiments to be carried out. Moreover, no theoretical knowledge about the physical and chemical *phenomena*, occurring during PDT, was required. The empirical optimization approach of the PDT, proposed herein, does not substitute itself to *in situ* dosimetry for which three possible

approaches to the dosimetry problem are described: (i) direct dosimetry, in which $^1\text{O}_2$ is measured [29]; (ii) explicit dosimetry, in which the three interconnected variables (light, oxygen and photosensitizer) are measured and the production of $^1\text{O}_2$ is estimated; (iii) implicit dosimetry, in which a surrogate for $^1\text{O}_2$ generation is deduced. Experimental design could be suggested such as a “nominal dosimetry” when light doses quantities and photosensitizer doses are not known. We limited our study to the factors the most widely considered. But, this experimental design could be also suggested to optimize other factors that could act on PDT outcome, *e.g.* formulation of the photosensitizer, mode of administration (*e.g.* intravenous, intraperitoneal, intratumoral) or light wavelength. We first demonstrated that a reduced value of fluence rate (50 *vs* 125 mW/cm²) leads to a more efficient photodynamic efficiency. Effectively, high fluence rates have been shown to reduce intratumor oxygen levels and thus, hypoxia during light irradiation can lead to poorer tumor response [30].

As a second result of the experimental design study, we showed that the best treatment compound was obtained with the Rut4 conjugate containing four arene ruthenium groups coordinated to PTP. But, despite a statistically significant *in vivo* photodynamic efficiency for Rut4 compared to Rut1, cellular localization in human oral carcinoma KB cells using fluorescence microscopy demonstrated that both conjugates Rut1 and Rut4 accumulated only in cytoplasm of KB cells but neither in the nucleus. With regard to their modes of action, ruthenium complexes have been assumed to target DNA comparable to platinum drugs and the DNA-binding properties of ruthenium compounds have been studied extensively mainly under cell-free conditions. However, although ruthenium has been detected in nuclei and bound to extracted DNA of cells after drug treatment, there is increasing evidence that the anticancer activity of some ruthenium compounds such as KP1019 and NAMI-A but also of some arene ruthenium complexes is not based on DNA damage [31-35]. Moreover, intracellular localization of photosensitizers *in vivo* may be strongly influenced by their complexation with blood proteins [36]. Indeed, experiments in which different photosensitizers were incubated with serum *in vitro* demonstrated that practically all photosensitizers can bind to a range of blood proteins, albeit with differing affinities. Upon administration into the bloodstream, most photosensitizers associate with various serum proteins including both high and low density lipoproteins (LDLs) and albumin [37]. LDLs are believed to be important in the transportation of hydrophobic photosensitizers. Alpha 2-macroglobulin/LDL receptors are widely found in cells of various types, with LDL uptake being most pronounced in adrenals, liver and spleen [36]. Ruthenium compounds were also characterized by a high affinity to serum proteins, which appeared crucial for drug

accumulation into the tumor tissue and to be responsible for the minor adverse effects observed in clinical trials with KP1019 [38]. The ligand set in ruthenium complexes is determinant for their therapeutic activity. Ruthenium complexes can bind to both transferrin and albumin when incubated with each protein alone in buffer conditions simulating physiological media [18]. However, in the blood serum they exhibit a preference for albumin [39] but transferrin specifically transports ruthenium to tumor cells thanks to the recognition of transferrin by transferrin receptors, highly expressed on tumor cells surface.

Pharmacokinetic and biodistribution studies have traditionally been used to select DLI. However, numerous studies have since shown that shorter DLI may lead to higher efficiency [40], which means that these studies may not always lead to the best choice of DLI [26]. In our case, we demonstrated that both complexes exhibited enhanced accumulation in KB tumors from 3 h to 96 h post-intravenous injection and the experimental design approach validated that the most suited value for DLI was not a short interval. Jones *et al.* reported the effects of PDT on tumor cells isolated from Foscan®-containing tumors compared to the effects of the tumor *in vivo* [25]. The authors demonstrated that tumor concentration rose quickly in the first 24 h and the maximum level in the tumor was about 0.55% of injected dose (0.3 mg/kg) at 24 h and after 48 h the concentration of Foscan® in the tumor declined rapidly. On the contrary, Rut4 accumulated slowly in the tumor tissue but at relevant levels which could reach 1.45% and 1.50% of injected dose (3 mg/kg) per gram of tumor tissue, 24 h and 48 h after injection, respectively followed by a very slow decline as at 96 h post-injection, the concentration in the tumor reached 1.40% of injected dose. Tumor pharmacokinetic parameters validated a relatively slow elimination of Rut4 compound (*e.g.* a biological half-life of 26.9 h), suggesting that intratumoral distribution of the conjugate could be less relevant for therapeutic efficacy than the total accumulation of the photosensitizer in the tumor tissue. Rut4 accumulated to high levels into organs of the reticuloendothelial system, corresponding also to rapidly perfused tissues (*i.e.* liver, spleen). This is in agreement with its hydrophobic character, like other lipophilic photosensitizers, *e.g.* Foscan® [25] or Photofrin® [41]. Brown *et al.* [42], using a dose of 2 mg Photofrin®/kg in patients, calculated a circulating-drug terminal half-life of 19 days. Bellnier *et al.*, reported measurable amounts of Photofrin® in human serum to approximately 1 year following injection of two different Photofrin® doses [41]. In this study, we calculated a circulating-¹⁰¹Ru half-life of 58.0 h.

The research question addressed in this paper deals with the optimization of the *in vivo* PDT modalities with ruthenium complexes. The usual methods are to test, either all the combinations of factors, which requires a large number of mice, or a step-by-step approach

wherein each factor is varied while the other ones are fixed. Nevertheless, because of the interactions between the factors involved in PDT, this approach remains unsatisfactory. An original approach was suggested in this study, based on an experimental design dosimetry. This is an alternative empirical approach that brings two main benefits for the optimization of *in vivo* PDT modalities: (1) no prior knowledge about photophysical or photochemical parameters is required and (2) the experimental cost is minimized. The three factors, fluence, fluence rate and photosensitizer dose, were simultaneously varied. The *in vivo* validation results confirmed relevance of the optimal conditions provided by the proposed empirical approach, mainly demonstrating that the best PDT compound was obtained with the Rut4 conjugate containing four arene ruthenium groups coordinated to PTP.

Acknowledgments. We thank Céline Frochot (LRGP, Nancy, France) for their assistance in determining the singlet oxygen quantum yields. Hedda Drexler (BOKU, Austria) is acknowledged for technical assistance regarding bio distribution analysis of ruthenium *via* ICP-MS.

Legends

Fig. 1. Molecular structure of (a) Rut1 [Ru(η^6 -*p*-Pr¹C₆H₄Me)(PMP)Cl₂] and Rut4 [Ru₄(η^6 -*p*-Pr¹C₆H₄Me)₄(PTP)Cl₈] complexes. Absorption spectra of (b) PMP (dark blue line), PTP (blue line), Rut1 (yellow line) and Rut4 (pink line). (c) UV-visible maximum absorption and molar extinction coefficients [λ ($\epsilon \times 10^3 \cdot \text{M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)] determined in ethanol. Fluorescence quantum yields at 421 nm (Φ_f^{421}) in methanol and singlet oxygen quantum yields ($\Phi^1\text{O}_2$) in ethanol.

Fig. 2. Effects of each X factor on IDGR. Each bar corresponds to b_i values, which is a model coefficient that quantifies the effect of each X factor on IDGR values when it switches from level 'ref' (low values) to high values. Each effect is measured by a b_i coefficient in the model and the estimated values of these coefficients are given in Table 4. The significant factors appear in red and orange colors. If the b value is negative it leads to a decrease of IDGR values (a decrease of tumor growth) and an increase of IDGR values if b value is positive. These results emphasize significant (significance level: $p < 0.1$) additive effects of four factors: X1, X3, X5 and X6. $n=4$ mice per treatment modality. X1, DLI (drug light interval); X2, concentration; X3, Fluence rate; X4, Fluence; X5, Ruthenium presence or not; X6, PMP or PTP compound. Mean \pm S.D.

Fig. 3. Time-dependent tumor growth curves after PDT. (a) Tumor growth curves for each experiment (see Table 3 for treatment modalities). (b) Kaplan-Meier curves of experiments 7 (in red), 8 (in blue), and 9 (in green) using Rut4 as photosensitizer. $n=4$ mice per treatment modality.

Fig. 4. Fluorescence intensity of (a) Rut1 and (b) Rut4 in tumor-bearing nude mice with a dose of 1.75 $\mu\text{mol/kg}$ using an optical fiber spectrofluorimeter at different times post-intra venous injection. $n=3$

Fig. 5. Pharmacokinetic analysis. (a) Biodistribution into different tissues with a dose of 1.75 $\mu\text{mol/kg}$ of Rut4 at 3h, 24h, 48h, 96h, 1 week and 2 weeks post-injection. (b) Ruthenium concentration, as a percentage of the injected dose per g of tumor (white circle) or per ml of plasma (black square), expressed as a function of time after an intra-venous injection with 1.75 $\mu\text{mol/kg}$ (3 mg/kg) of Rut4 (data points show the mean \pm S.D., $n=3$). (c) Plasma pharmacokinetic parameters calculated using a non-compartmental method: The plasma or

tumor concentrations of Rut4 at time zero were estimated by extrapolation of the log concentration *vs* time graph back to zero. The area under the concentration *vs* time graph (AUC) was calculated from time zero to the last time point ($T(336)$) by the trapezoidal rule. The area under the (concentration \times time) *vs* time curve (AUMC) was calculated from time zero to $T(\text{last})$ by the trapezoidal rule and $T(\text{last})$ to infinity as $\text{Area} = C(\text{last}) / (k')^2$. Mean residence time $\text{MRT} = \text{AUMC} / \text{AUC}$. Half-life $T_{1/2} = \text{MRT} \times \ln(2)$. Elimination rate constant $K_{el} = 1 / \text{MRT}$.

Fig. 6. Visualization of cellular uptake of Rut1 and Rut4 (in red, $\lambda_{exc} = 460\text{-}490$ nm, $\lambda_{em} = 510\text{-}550$ nm) and nuclear staining (in blue, $\lambda_{exc} = 330\text{-}385$ nm, $\lambda_{em} = 420\text{-}460$ nm) by fluorescence microscopy for KB cells exposed for 24 h to Rut1 (**a**) and Rut4 (**b**), both at 10 μM .

References

- [1] H. Benachour, C. Frochot, R. Vanderesse, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, in: E. Salvatti (eds), *Targeting Strategies in Photodynamic Therapy*, Nova Publishers, 2011, pp. 1-38.
- [2] C. Lottner, R. Knuechel, G. Bernhardt, H. Brunner, Distribution and subcellular localization of a water-soluble hematoporphyrin-platinum(II) complex in human bladder cancer cells, *Cancer Lett.* 215 (2) (2004) 167-77.
- [3] C. Lottner, R. Knuechel, G. Bernhardt, H. Brunner, Combined chemotherapeutic and photodynamic treatment on human bladder cells by hematoporphyrin-platinum(II) conjugates, *Cancer Lett.* 203 (2) (2004) 171-80.
- [4] J. Mao, Y. Zhang, J. Zhu, C. Zhang, Z. Guo, Molecular combo of photodynamic therapeutic agent silicon(IV) phthalocyanine and anticancer drug cisplatin, *Chem. Commun. (Camb)* (8) (2009) 908-10.
- [5] C. Lottner, K. C. Bart, G. Bernhardt, H. Brunner, Hematoporphyrin-derived soluble porphyrin-platinum conjugates with combined cytotoxic and phototoxic antitumor activity, *J. Med. Chem.* 45 (10) (2002) 2064-78.
- [6] Y. S. Kim, R. Song, D. Hyun Kim, M. J. Jun, Y. S. Sohn, Synthesis, biodistribution and antitumor activity of hematoporphyrin-platinum(II) conjugates, *Bioorg. Med. Chem.* 11 (8) (2003) 1753-60.
- [7] Y. P. Ho, S. C. Au-Yeung, K. K. To, Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives, *Med. Res. Rev.* 23 (5) (2003) 633-55.
- [8] E. Cvitkovic, Ongoing and unsaid on oxaliplatin: the hope, *Br. J. Cancer* 77 (4) (1998) 8-11.
- [9] M. J. Hannon, Supramolecular DNA recognition, *Chem. Soc. Rev.* 36 (2) (2007) 280-95.
- [10] G. Jaouen, *Bioorganometallics: Biomolecules, Labeling, Medicine*, G. Jouen ed., John Wiley & Sons, 2006.
- [11] F. Schmitt, P. Govindaswamy, G. Suss-Fink, W. H. Ang, P. J. Dyson, L. Juillerat-Jeanneret, B. Therrien, Ruthenium porphyrin compounds for photodynamic therapy of cancer, *J. Med. Chem.* 51 (6) (2008) 1811-6.
- [12] F. Schmitt, P. Govindaswamy, O. Zava, G. Suss-Fink, L. Juillerat-Jeanneret, B. Therrien, Combined arene ruthenium porphyrins as chemotherapeutics and photosensitizers for cancer therapy, *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (1) (2009) 101-9.
- [13] T. Gianferrara, I. Bratsos, E. Iengo, B. Milani, A. Ostric, C. Spagnul, E. Zangrando, E. Alessio, Synthetic strategies towards ruthenium-porphyrin conjugates for anticancer activity, *Dalton Trans.* (48) (2009) 10742-56.
- [14] T. Gianferrara, B. Serli, E. Zangrando, E. Iengo, E. Alessio, Pyridylporphyrins peripherally coordinated to ruthenium-nitrosyls, including the water-soluble $\text{Na}_4[\text{Zn}_4\text{TPyP}\{\text{RuCl}_4(\text{NO})\}_4]$: synthesis and structural characterization, *New J. Chem.* 29 (2005) 895-903.
- [15] W. H. Ang, P. J. Dyson, Classical and non-classical ruthenium-based anticancer drugs: towards targeted chemotherapy, *Eur. J. Chem.* (2006) 4003-4018.
- [16] F. Kratz, M. Hartmann, B. Keppler, L. Messori, The binding properties of two antitumor ruthenium(III) complexes to apotransferrin, *J. Biol. Chem.* 269 (4) (1994) 2581-8.
- [17] M. Klajner, P. Hebraud, C. Sirlin, C. Gaidon, S. Harlepp, DNA binding to an anticancer organo-ruthenium complex, *J. Phys. Chem. B* 114 (44) (2010) 14041-7.

- [18] A. Levina, A. Mitra, P. A. Lay, Recent developments in ruthenium anticancer drugs, *Metallomics* 1 (6) (2009) 458-70.
- [19] F. Schmitt, M. Auzias, P. Stepnicka, Y. Sei, K. Yamaguchi, G. Süß-Fink, B. Therrien, L. Juillerat-Jeanneret, Sawhorse-type diruthenium tetracarbonyl complexes containing porphyrin-derived ligands as highly selective photosensitizers for female reproductive cancer cells, *J. Biol. Inorg. Chem.* 14 (2009) 693-701.
- [20] M.A. Biel, Photodynamic therapy of head and neck cancers, *Methods Mol. Biol.* 635 (2010) 281-93.
- [21] J. Gravier, R. Schneider, C. Frochot, T. Bastogne, F. Schmitt, J. Didelon, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Improvement of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. synthesis and in vivo delivery studies, *J. Med. Chem.* 51 (13) (2008) 3867-77
- [22] L. Tirand, T. Bastogne, D. Bechet, M. Linder, N. Thomas, C. Frochot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Response surface methodology: an extensive potential to optimize in vivo photodynamic therapy conditions, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 75 (1) (2009) 244-52.
- [23] T. Bastogne, A. Samson, P. Vallois, S. Wantz-Mézières, S. Pinel, D. Bechet, M. Barberi-Heyob, Phenomenological modeling of tumor diameter growth based on a mixed effects model, *J. Theor. Biol.* 262 (2010) 544-552.
- [24] P.J. Houghton, C.L. Morton, C. Tucker, D. Payne, E. Favours, C. Cole, R. Gorlick, E.A. Kolb, W. Zhang, R. Lock, H. Carol, M. Tajbakhsh, C.P. Reynolds, J. M. Maris, J. Courtright, S.T. Keir, H.S. Friedman, C. Stopford, J. Zeidner, J. Wu, T. Liu, C.A. Billups, J. Khan, S. Ansher, J. Zhang, M.A. Smith, The pediatric preclinical testing program: description of models and early testing results, *Pediatr. Blood and Cancer* 49 (2007) 928–940
- [25] H. J. Jones, D. I. Vernon, S. B. Brown, Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan) in vivo: correlation with pharmacokinetics, *Br. J. Cancer* 89, (2) (2003) 398-404.
- [26] P. Cramers, M. Ruevekamp, H. Oppelaar, O. Dalesio, P. Baas, F. A. Stewart, Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy, *Br. J. Cancer* 88, (2) (2003) 283-90.
- [27] B. W. Pogue, J. A. O'Hara, E. Demidenko, C. M. Wilmot, I. A. Goodwin, B. Chen, H. M. Swartz, T. Hasan, Photodynamic therapy with verteporfin in the radiation-induced fibrosarcoma-1 tumor causes enhanced radiation sensitivity, *Cancer Res.* 63 (5) (2003) 1025-33.
- [28] O. Bourdon, I. Laville, D. Carrez, A. Croisy, P. Fedel, A. Kasselouri, P. Prognon, P. Legrand, J. Blais, Biodistribution of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin incorporated into surface-modified nanocapsules in tumor-bearing mice, *Photoche. Photobiol. Sci.* 1 (9) (2002) 709-14.
- [29] B. C. Wilson, M. S. Patterson, The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy, *Phys. Med. Biol.* 53, (9) (2008) R61-109.
- [30] T. M. Busch, E. P. Wileyto, M. J. Emanuele, F. Del Piero, L. Marconato, E. Glatstein, C. J. Koch, Photodynamic therapy creates fluence rate-dependent gradients in the intratumoral spatial distribution of oxygen, *Cancer Res.* 62 (24) (2002) 7273-9.
- [31] P. Heffeter, K. Bock, B. Atil, M. A. Reza Hoda, W. Korner, C. Bartel, U. Jungwirth, B. K. Keppler, M. Micksche, W. Berger, G. Koellensperger, Intracellular protein binding patterns of the anticancer ruthenium drugs KP1019 and KP1339, *J. Biol. Inorg. Chem.* 15 (5) (2010) 737-48.
- [32] P. C. Bruijninx, P. J. Sadler, New trends for metal complexes with anticancer activity, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12 (2) (2008) 197-206.
- [33] T. Chen, Y. Liu, W. J. Zheng, J. Liu, Y. S. Wong, Ruthenium polypyridyl complexes that induce mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells, *Inorg. Chem.* 49 (14) (2010) 6366-8.

- [34] M. Clarke, Ruthenium Metallopharmaceuticals, *Coord. Chem. Rev.* 236 (2003) 209-233.
- [35] M. J. Clarke, F. Zhu, D. R. Frasca, Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals, *Chem. Rev.* 99 (9) (1999) 2511-34.
- [36] A. A. Rosenkranz, D. A. Jans, A. S. Sobolev, Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency, *Immunol. Cell Biol.* 78 (4) (2000) 452-64.
- [37] H. J. Hopkinson, D. I. Vernon, S. B. Brown, Identification and partial characterization of an unusual distribution of the photosensitizer meta-tetrahydroxyphenyl chlorin (temoporfin) in human plasma, *Photochem. Photobiol.* 69 (4) (1999) 482-8.
- [38] M. Sulyok, S. Hann, C. Hartinger, B. Keppler, G.; Stingeder, G. Koellensperger, Two dimensional separation schemes for investigation of the interaction of an anticancer ruthenium(III) compound with plasma proteins, *J. Anal. At. Spectrom.* 20 (9) (2005) 856-863.
- [39] N. Cetinbas, M. I. Webb, J. A. Dubland, C. J. Walsby, Serum-protein interactions with anticancer Ru(III) complexes KP1019 and KP418 characterized by EPR, *J. Biol. Inorg. Chem.* 15 (2) (2010) 131-45.
- [40] B. Chen, T. Roskams, P. A. de Witte, Antivascular tumor eradication by hypericin-mediated photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.* 76 (5) (2002) 509-13.
- [41] D. A. Bellnier, T. J. Dougherty, A preliminary pharmacokinetic study of intravenous Photofrin in patients, *J. Clin. Laser Med. Surg.* 14 (5) (1996) 311-4.
- [42] S. Brown, D. Vernon, J. Holroyd, S. Marcus, R. Trust, W. Hawkins, A. Shah, A. Tonelli, in: P. Spinelli, M. Dal Fante, R. Marchesini (Eds), *Pharmacokinetics of Photofrin in man*, Elsevier Science, Amsterdam, 1992, pp 475-479.

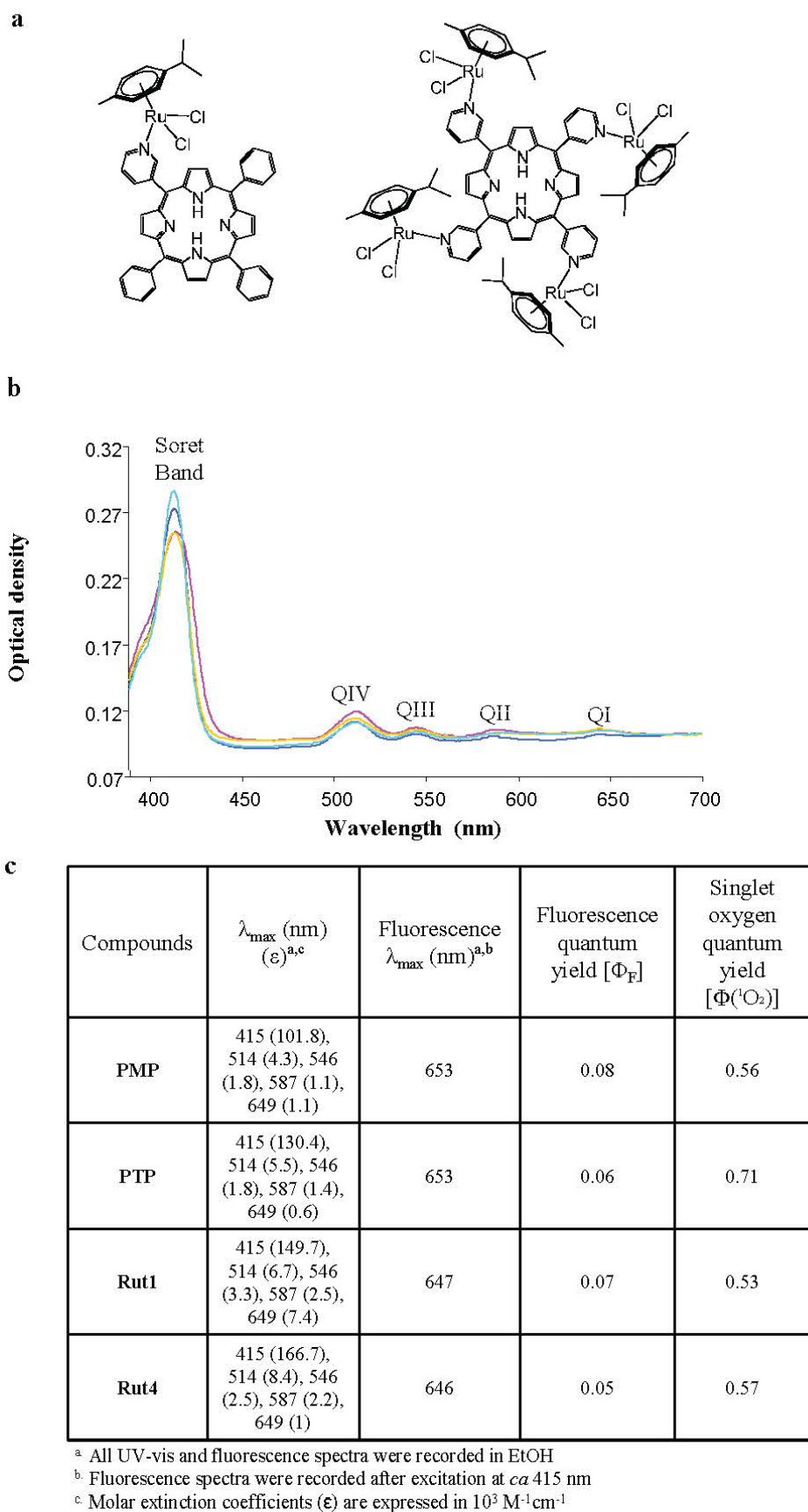


Figure 1.

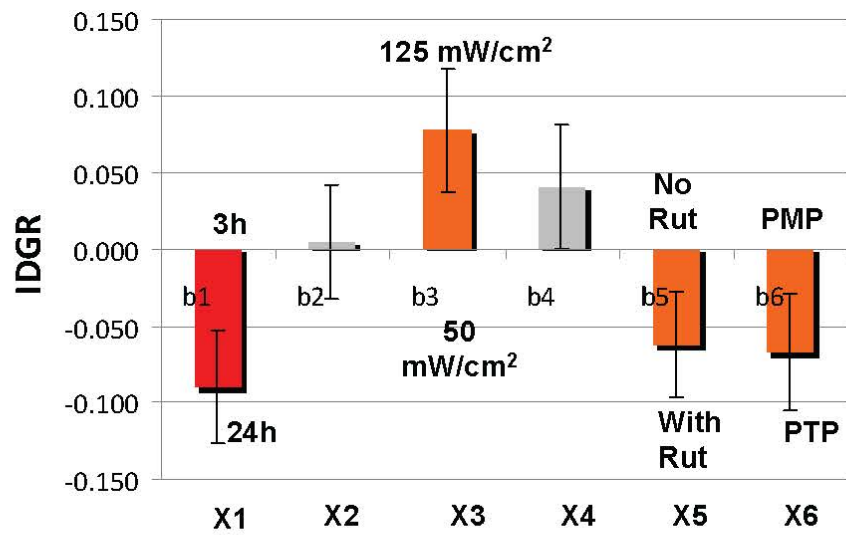


Figure 2.

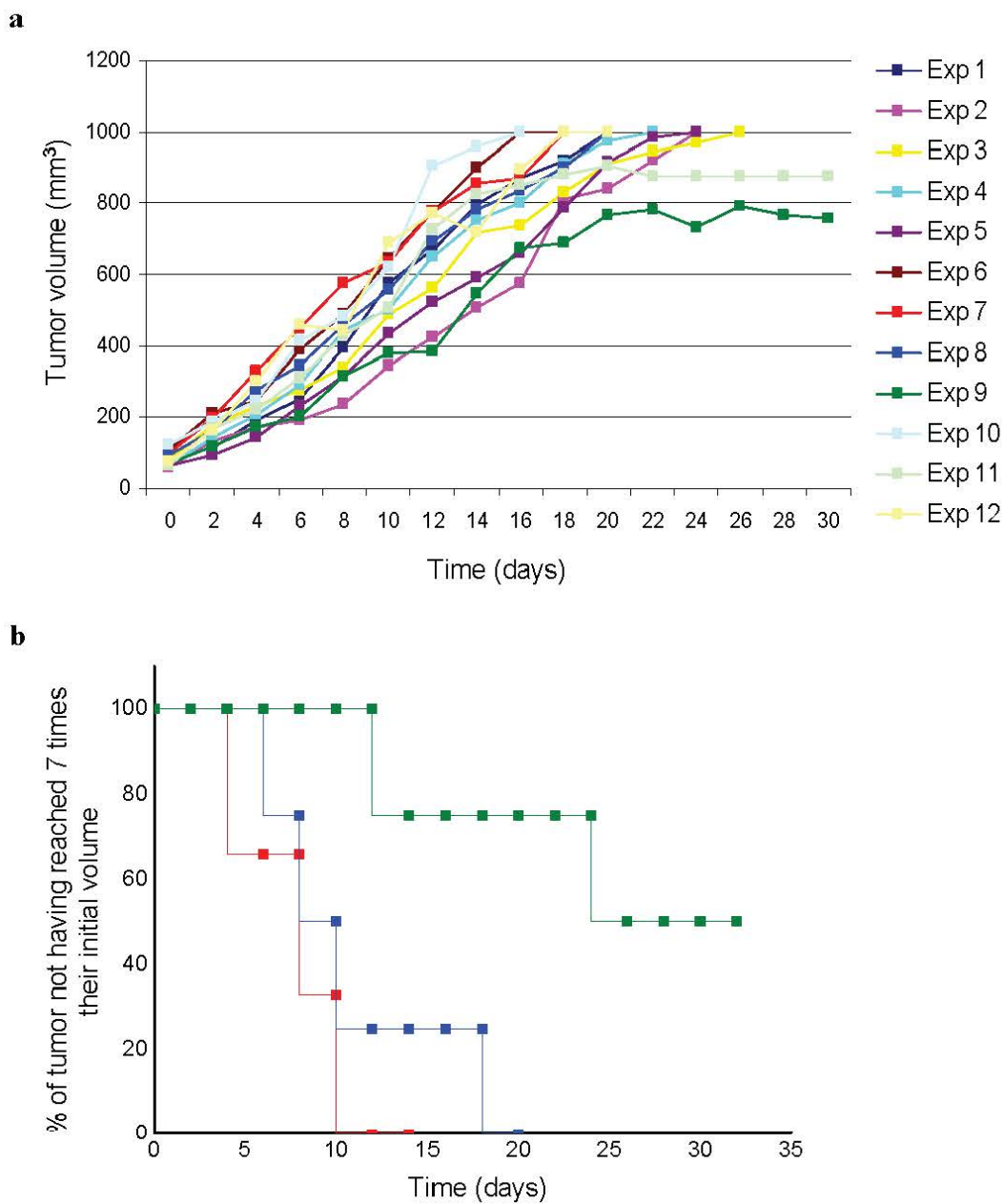
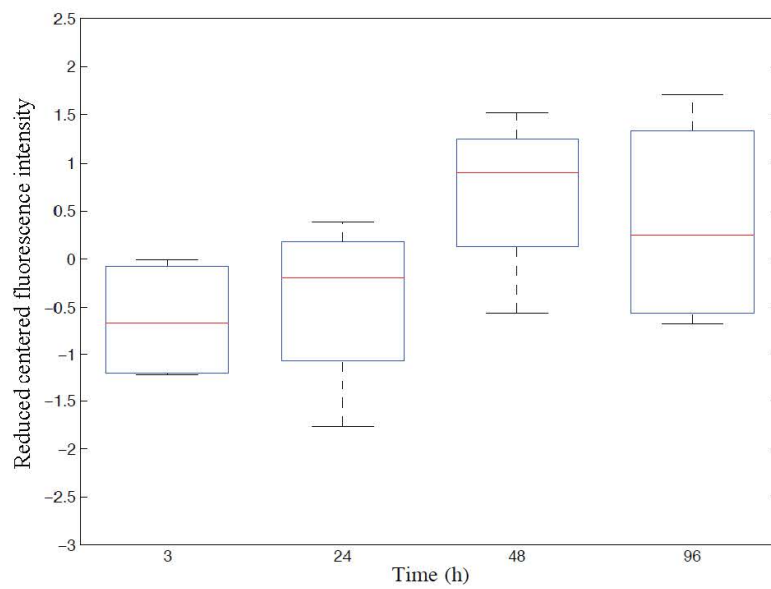


Figure 3.

a



b

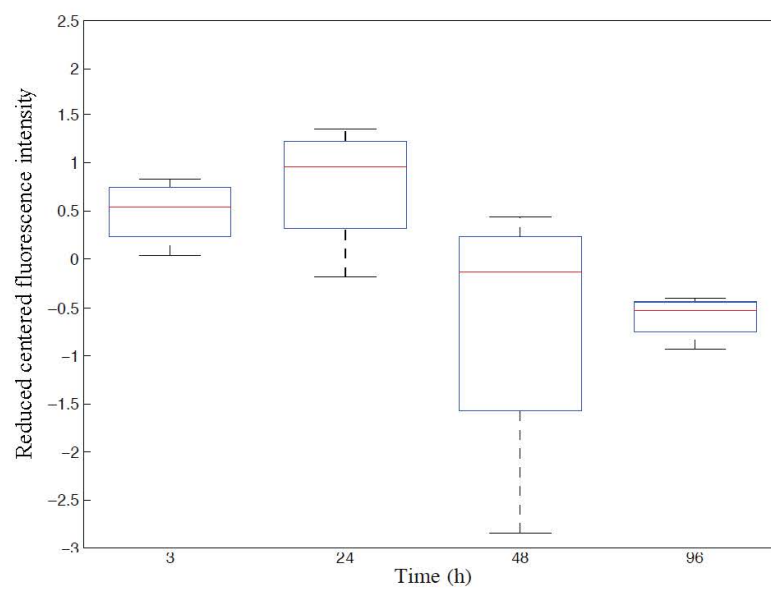


Figure 4.

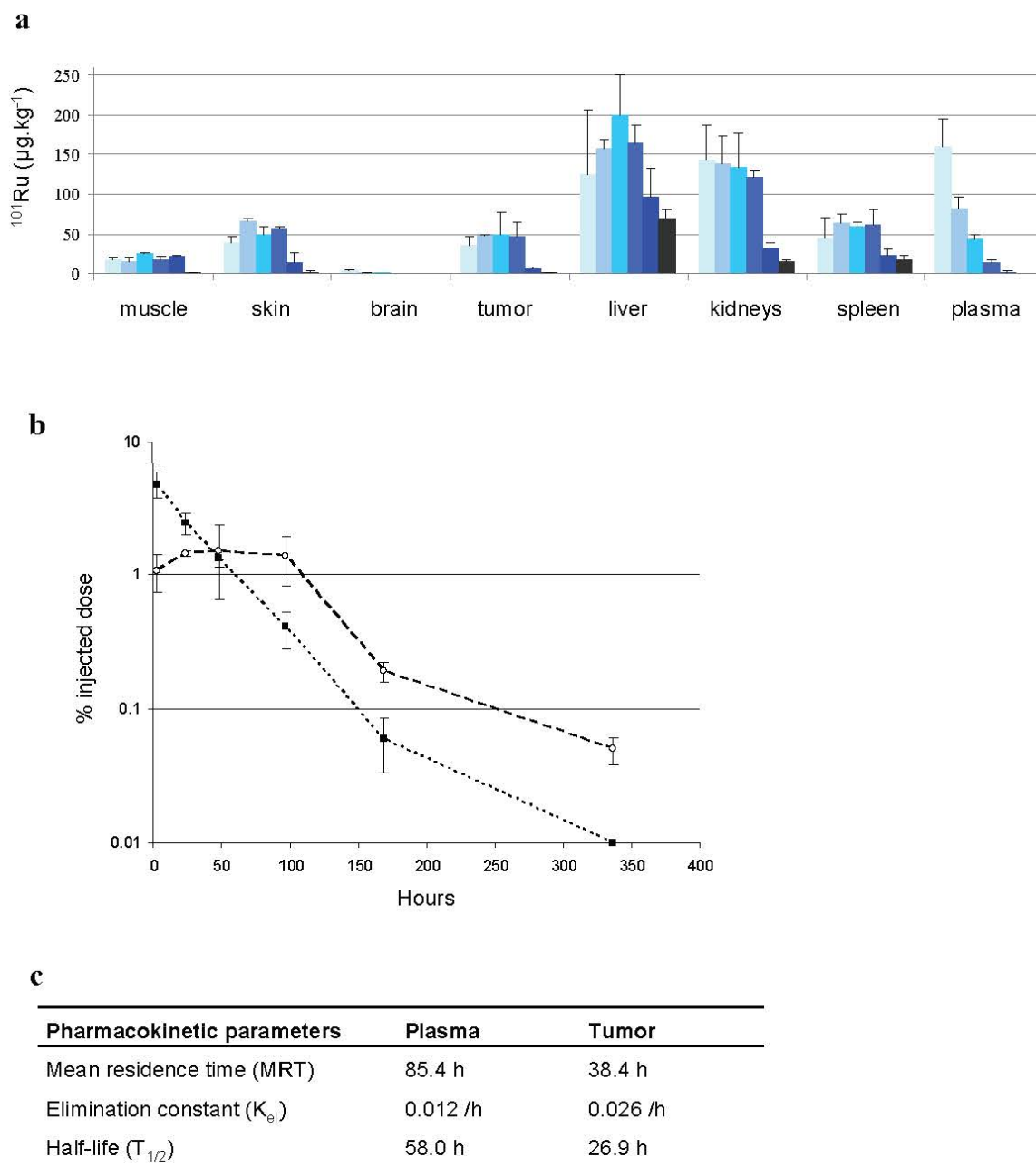


Figure 5.

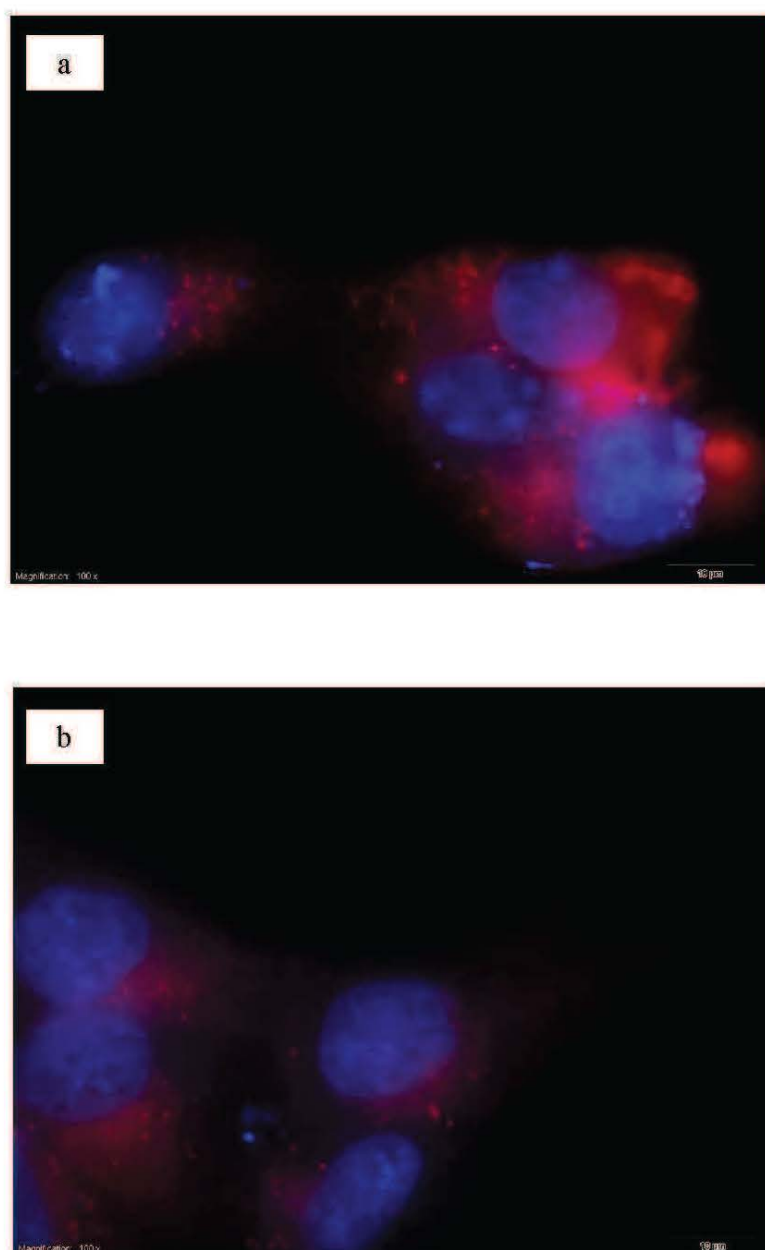


Figure 6.

Table 1. Biological factors of the experimental experiment.

Notation	Factor	Unit	Nb levels	Levels	
				-	+
X1	Drug-light interval	h	2	3	24
X2	PS Concentration	$\mu\text{mol/Kg}$	2	0.44	1.75
X3	Fluence rate	mW/cm^2	2	50	125
X4	Fluence	J/cm^2	2	10	150
X5	Ruthenium		2	No Rut.	with Rut.
X6	Photosensitizer		2	PMP	PTP

Table 2. Mathematical model associated with the experiment design chosen and implemented in this study. Each model coefficient, presented below is used to measure the additive effects and some interactions between the six biological factors listed in Table 1.

$$Y = b_0 + b_1 * (X_1) + b_2 * (X_2) + b_3 * (X_3) + b_4 * (X_4) + b_5 * (X_5) + b_6 * (X_6) + b_{12} * (X_1 * X_2) + b_{24} * (X_2 * X_4) + b_{56} * (X_5 * X_6) + E$$

Coeff.	Description
b0	mean response
b1	additive effect of X1 when it varies from level (-) to level (+)
b2	additive effect of X2 when it varies from level (-) to level (+)
b3	additive effect of X3 when it varies from level (-) to level (+)
b4	additive effect of X4 when it varies from level (-) to level (+)
b5	additive effect of X5 when it varies from level (-) to level (+)
b6	additive effect of X6 when it varies from level (-) to level (+)
b12	synergistic effect of the interaction between X1 and X2
b24	synergistic effect of the interaction between X2 and X4
b56	synergistic effect of the interaction between X5 and X6
E	random additive error on the response

Table 3. Experimental design & treatment modalities. This experimental setup is based on an Hadamard structure with only 12 distinct experiments instead of 72 for a full factorial design.

N° exp.	Drug-light interval X1	Fluence rate (mW/cm ²) X3	Fluence (J/cm ²) X4	Compound: concentration (µmol/kg) X2-X5-X6	Light power fiber output (mW)	Time of irradiation (min)	Mean IDGR response Y
1	3	50	150	Rut1:1.75	157	50 min	0.46
2	24	125	10	Rut1:1.75	392	1 min 20	0.42
3	24	125	10	Rut1:0.44	392	1 min 20	0.44
4	24	50	150	PMP: 0.44	157	50 min	0.50
5	24	125	10	PMP: 1.75	392	1 min 20	0.51
6	3	50	10	PMP: 0.44	157	3 min 20	0.55
7	3	125	150	Rut4: 1.75	392	20 min	0.44
8	3	50	150	Rut4: 0.44	157	50 min	0.45
9	24	50	10	Rut4: 0.44	157	3 min 20	0.03
10	3	125	150	PTP: 0.44	392	20 min	0.57
11	24	50	150	PTP: 1.75	157	50 min	0.55
12	3	125	10	PTP: 1.75	392	1 min 20	0.63

Table 4. Estimates of the model coefficients and their significance

Coeff.	Values	S.D.	Signif. %
b0	0.455	0.034	
b1	-0.090	0.037	2.21**
b2	0.005	0.037	89
b3	0.077	0.040	6*
b4	0.041	0.041	31.8
b5	-0.063	0.034	7.9*
b6	-0.067	0.038	8.8*
b1-2	-0.008	0.040	84.2
b2-4	-0.019	0.044	67.1
b5-6	-0.002	0.040	96.5

(**): $p < 0.05$ (*): $p < 0.1$

2. Détermination des conditions optimales de traitement pour Rut4

a. Matériel et méthodes

- Animaux et modèle tumoral

Des souris *nude* (nu/nu) femelles, non consanguines ont été utilisées pour cette étude (Janvier, St Berthevin, France). Les conditions de l'étude, l'hébergement et les soins aux animaux ont été réalisés en accord avec la convention européenne pour la protection des animaux vertébrés, les directives européennes et les lois françaises sur l'expérimentation animale. Les animaux ont été manipulés dès l'âge de 9 semaines. Pour entretenir les tumeurs *in vivo*, les souris ont reçu une injection en sous-cutanée dans l'aîne de cellules de carcinome oral humain KB. Lorsque les tumeurs ont atteint un volume de 500mm³, les souris ont été anesthésiées par injection intra-péritonéale d'un mélange de 60mg/kg de kétamine (Kétalar[®], Panpharma, Fougères, France) et de 80mg/kg de xylazine (Rompun[®], Bayer Pharma, Puteaux, France), puis euthanasiées par dislocation cervicale. Les tumeurs ont été extraites, coupées en morceaux de 1 mm³ de volume et réimplantées en sous-cutanée dans l'aîne d'autres souris.

- Traitement photodynamique des tumeurs

Le composé Rut4 a été dissout dans un mélange de polyéthylène glycol (PEG) 400, éthanol 96° et eau (30/20/50, v/v/v) aux concentrations indiquées dans la matrice expérimentale. Le composé a été injecté par voie i.v. dans une des veines de la queue. Les tumeurs ont été irradiées à la longueur d'onde de 514 nm par un laser à l'argon (model 375B; Spectra-Physics, Les Ulis, France). La lumière a été délivrée par une fibre optique (HCG type; SEDI Fibres Optiques, Courcouronnes, France) et un diffuseur de lumière plan (Frontal Diffuser FDI; Medlight SA, Ecublens, Suisse) permettant un spot de lumière homogène sur une surface de 2 cm de diamètre. La puissance en sortie de fibre a été évaluée à l'aide d'un puissancemètre optique (model SP407; SpectraPhysics). Après PDT, le volume tumoral a été calculé selon la formule :

$$V = (\text{longueur} \times \text{largeur}^2) / 2$$

Les mesures ont été réalisées durant 2 mois ou bien jusqu'à ce que la tumeur atteigne un volume éthique de 1000 mm³. Les souris ont ensuite été sacrifiées par dislocation cervicale.

- Planification d'expériences et analyses statistiques

Le modèle mathématique suivant a été utilisé pour estimer la présence ou non d'un effet synergique entre les 3 facteurs d'impact en PDT, dose de photosensibilisateur, fluence et irradiance (**Tableau IX**) sur la réponse tumorale, c'est à dire sur le taux de croissance tumorale estimé par l'IDGR [210] :

$$Y = b_0 + b_1 * X_1 + b_2 * X_2 + b_3 * X_3 + b_{1-1} * (X_1 * X_1) + b_{2-2} * (X_2 * X_2) + b_{3-3} * (X_3 * X_3) + b_{1-2} * (X_1 * X_2) + b_{1-3} * (X_1 * X_3) + b_{2-3} * (X_2 * X_3)$$

Y est la variable de réponse (IDGR), X_i représente le $i^{\text{ème}}$ facteur et b_i le coefficient qui quantifie l'effet des différents facteurs X_i sur la réponse tumorale lorsque ces facteurs prennent une valeur définie par leurs 3 niveaux. b_0 correspond à la réponse de référence, *i.e.* la réponse obtenue lorsque les différents facteurs prennent leur valeur de niveau de référence. Les coefficients du modèle et leur significativité statistique ont été évalués par analyse de la variance (ANOVA) et par le test T de Student, à l'aide du logiciel Nemrod-W[®]. Le niveau de significativité a été placé à $p < 0,05$.

b. Résultats et discussion

Le plan d'expérience utilisé dans la partie III, II. 1. a permis d'effectuer un « screening », considéré comme un plan exploratoire, des différents facteurs d'impact sur la réponse Y afin d'extraire ceux qui apparaissaient comme les plus influents. Le modèle mathématique utilisé avait pour but d'étudier l'effet additif des 6 facteurs sur la réponse tumorale (sans interaction), permettant ainsi de limiter le nombre d'expériences réalisées. Nous en avons déduit l'importance des facteurs Rut4 et IDL sur la réponse tumorale au traitement photodynamique. L'étude du facteur IDL a été approfondie grâce à des études de biodistribution et des données en pharmacocinétique. Le délai retenu, car le plus favorable à une accumulation tumorale, a été fixé à 24 heures après l'injection par voie i.v. Afin d'optimiser les conditions de traitement photodynamique (dose de photosensibilisateur, fluence et irradiance), nous avons utilisé un plan d'expérience basé sur un modèle quadratique, nous permettant d'évaluer l'interaction entre ces 3 facteurs.

En adéquation avec les résultats de biodistribution, l'IDL a été fixé à 24 heures tandis que l'influence des trois facteurs (dose de Rut4 injectée, fluence et irradiance) a été étudiée en suivant le domaine expérimental défini dans le **tableau V**.

Tableau V : Domaine expérimental pour l'optimisation de Rut4.

	Facteurs	Unité	Centre	Pas de variation
U1	Concentration en PS	$\mu\text{mol/kg}$	1,15	0,65
U2	Fluence	J/cm^2	80	70
U3	Irradiance	mW/cm^2	100	50

Chaque facteur peut prendre trois valeurs, définies par une valeur centrale et son pas de variation (+/-). La réalisation de ce plan d'expérience à partir de ces trois facteurs correspond à 15 conditions de traitement, testées sur 5 souris chacune (**Tableau VI**). Le composé Rut4 présente un coefficient d'extinction molaire le plus élevé à 514 nm [4].

Tableau VI : Plan d'expérience et modalités de traitement pour l'optimisation de Rut4.

N°Exp	Concentration en PS $\mu\text{mol/kg}$	Fluence J/cm^2	Irradiance mW/cm^2	Puissance en sortie de fibre mW	Temps d'irradiation
1	0.5	10	50	157	3 min 20
2	1.8	10	50	157	3 min 20
3	0.5	150	50	157	50 min
4	1.8	150	50	157	50 min
5	0.5	10	150	471	1 min 07
6	1.8	10	150	471	1 min 07
7	0.5	150	150	471	16 min 40
8	1.8	150	150	471	16 min 40
9	0.5	80	100	314	13 min 20
10	1.8	80	100	314	13 min 20
11	1.15	10	100	314	1 min 40
12	1.15	150	100	314	25 min
13	1.15	80	50	157	26 min 40
14	1.15	80	150	471	8 min 53
15	1.15	80	100	314	13 min 20

L'analyse statistique des résultats (**Tableau VII**) met en évidence un effet statistiquement significative de l'interaction entre les facteurs dose de Rut4 et fluence sur le retard de croissance tumorale ($p = 0,01$). L'irradiance seule ou en association avec les autres facteurs testés ne montre aucun effet significatif sur la réponse tumorale post-PDT.

Tableau VII : Résultats de l'étude statistique du plan d'expérience pour l'optimisation de Rut4.

	Df	Sum Sq	Mean Sq	F value	Pr(>F)	
CPS	1	0.00146	0.001464	0.1199	0.731357	
F	1	0.00967	0.009672	0.7924	0.380018	
I	1	0.00955	0.009548	0.7822	0.383053	
CPS:F	1	0.09390	0.093896	7.6926	0.009173	**
CPS:I	1	0.00146	0.001464	0.1199	0.731357	
F:I	1	0.00581	0.005808	0.4758	0.495286	
CPS:F:I	1	0.00350	0.003497	0.2865	0.596179	
Residuals	32	0.39059	0.012206			

Signification des codes: [**], $p = 0,01$.

L'analyse ANOVA de l'interaction des facteurs concentration en Rut4 et fluence en fonction de leurs différentes valeurs, a mis en évidence un effet synergique sur le retard de croissance tumorale entre une concentration forte en Rut4 ($1,8 \mu\text{mol/kg}$) et une fluence faible (10 ou 80 J/cm^2) ($p=0,01$) (**Figure 26**). L'association de ces facteurs, fixés à ces valeurs, fait significativement diminuer l'IDGR. Ces deux conditions de traitement ont été retenues pour tester notre modèle.

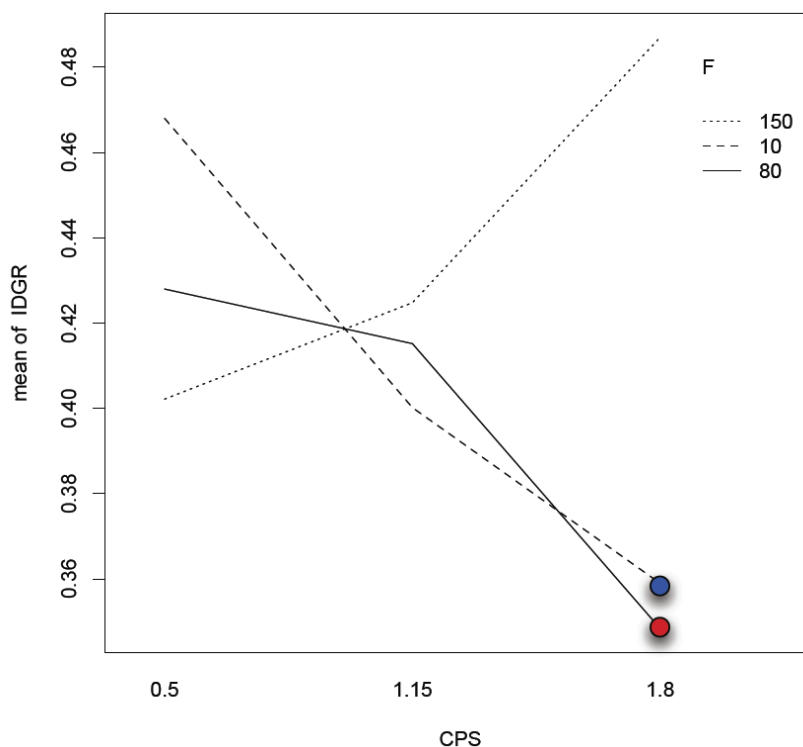


Figure 26 : Représentation graphique de la synergie entre concentration en Rut4 et fluence. Les valeurs de concentration en Rut4 testées sont $0,5$, $1,15$ et $1,8 \mu\text{mol/kg}$. Les valeurs de fluence testées sont 10 , 80 et 150 J/cm^2 . IDL 24h. $\lambda_{\text{exc}} = 514 \text{ nm}$. $N = 5$ souris.

Cette relation inverse entre concentration forte en Rut4 (1,8 $\mu\text{mol/kg}$) et une fluence faible (10 J/cm^2) ne correspond pas aux résultats caractéristiques d'une dose photodynamique efficace, dont l'équation est la suivante :

$$\text{Dose photodynamique} = [\text{PS}] \times \varphi \times t \times \varepsilon \times [{}^3\text{O}_2] \times \Phi_{\Delta}({}^1\text{O}_2)$$

où, [PS] est la quantité de photosensibilisateur dans le tissu (mol/L), φ est l'irradiance lumineuse (W/cm^2), t est le temps d'irradiation (s), ε est le coefficient d'extinction molaire du photosensibilisateur à la longueur d'onde d'irradiation (L/mol/cm), $[\text{O}_2]$ est la concentration en oxygène moléculaire dans le tissu (mol/L) et $\Phi_{\Delta}({}^1\text{O}_2)$ est le rendement quantique de formation d'oxygène singulet. $\Phi \times t$ représente la fluence lumineuse (J/cm^2).

De plus, de nombreuses études ont démontré l'effet synergique positif entre concentration en photosensibilisateur et fluence élevée, ou inversement, sur la réponse tumorale [210, 212, 214-216].

Dans cette étude, trois valeurs d'irradiance ont été étudiées : 50, 100 et 150 mW/cm^2 . Dans les facteurs étudiés, l'irradiance n'affecte pas de façon significative la réponse tumorale post-PDT en dépit de la valeur étudiée (50, 100 ou 150 mW/cm^2). Dans notre première étude [4], la valeur élevée d'irradiance (125 mW/cm^2) avait pour effet d'augmenter significativement l'IDGR (perte d'efficacité de la PDT) par comparaison à la valeur de référence de 50 mW/cm^2 . Une irradiance élevée a un effet délétère sur le retard de croissance tumoral induit en PDT [210, 217]. En effet, une irradiance élevée (forte puissance) induit une consommation photochimique accrue et rapide en oxygène moléculaire [217]. Nos résultats parus dans *Journal of Photochemistry and Photobiology B* confirment cette observation [4].

Pour la validation du modèle avec Rut4, l'irradiance a été fixée à 80 mW/cm^2 , la dose de Rut4 et la fluence ont été fixées à 1,8 $\mu\text{mol/kg}$ et 10 J/cm^2 , respectivement.

3. Efficacité anti-tumorale du composé Rut4 avec les conditions optimales de traitement

a. Matériel et méthodes

- Animaux et modèle tumoral

Les animaux et le modèle tumoral utilisés demeurent les mêmes que précédemment (**Conf. PARTIE III, II. 2.**).

- Traitement photodynamique des tumeurs

L'irradiation tumorale suit également le même protocole que celui utilisé précédemment (**Conf. PARTIE III, II. 2.**).

- Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en appliquant le *Log-rank test*, à l'aide du logiciel StatView[®] (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

b. Résultats et discussion

Nous avons étudié l'efficacité du composé Rut4 en PDT sur un modèle de souris *nude* xénogreffées en ectopique avec les cellules KB. Nous avons utilisé les paramètres optimaux fixés précédemment pour le composé Rut4 (**Conf. PARTIE III, II. 2.**) : concentration en Rut4 de 1,8 $\mu\text{mol/kg}$, fluence de 10 J/cm^2 et irradiance de 80 mW/cm^2 . Une longueur d'onde de 514 nm a été utilisée pour l'irradiation des tumeurs sous-cutanées. En accord avec les études de biodistribution et de pharmacocinétique, nous avons gardé l'IDL de 24 heures [4]. Les résultats d'efficacité anti-tumorale du composé Rut4 en PDT sont donnés sous la représentation graphique de Kaplan-Meyer. Il n'y a pas de différence significative d'efficacité entre les groupes IDL 24h et témoins (**Figure 27**).

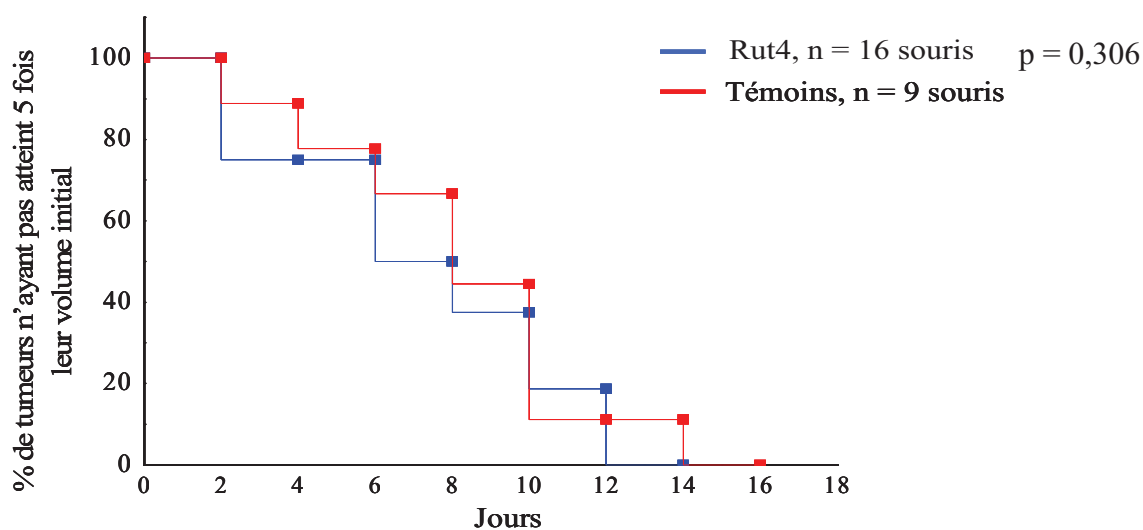


Figure 27 : Représentation de Kaplan-Meier de la croissance tumorale des tumeurs KB après PDT avec Rut4 (bleu, n = 16 souris) par comparaison au groupe témoin (rouge, n = 9 souris). Dose de Rut4 : $1,8 \mu\text{mol/kg}$, IDL : 24h, fluence : 10 J/cm^2 , irradiance : 80 mW/cm^2 . *Log-rank test* : $p = 0,306$.

Pour une pénétration optimale de la lumière dans les tissus, la longueur d'onde d'irradiation doit se situer dans les longueurs d'onde proches de l'IR (**Figure 5**). La porphyrine contrairement aux chlorines, présente un coefficient d'extinction molaire dans le rouge faible ($\epsilon_{652 \text{ nm}} = 1,0 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, dans l'éthanol) ([4], Figure 1). Or nous avons vu dans le chapitre I. 2. de la Partie I que la mélanine et l'hémoglobine absorbaient les photons à cette longueur d'onde, peu favorable au traitement photodynamique pour des lésions supérieures à 2 voire 3 mm (**Figure 5**). A cette longueur d'onde, la tetra-3-pyridylchlorine présente une valeur de coefficient d'extinction molaire plus favorable de $11,6 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Nous avons donc choisi de tester ce conjugué en remplaçant la porphyrine par une chlorine avec 4 arènes ruthénium (ChloRut).

III. Couplage de la chlorure au ruthénium

1. Détermination des conditions optimales de traitement pour ChloRut

a. Matériel et méthodes

- Synthèse chimique de ChloRut

Le photosensibilisateur $\text{Ru}_4(\eta^6\text{-}p\text{-Pr}^i\text{C}_6\text{H}_4\text{Me})_4(\text{tetra-3-pyridylchlorure})\text{Cl}_8$, nommé ChloRut, a été synthétisé et purifié comme décrit dans la référence [218]. La chlorure a été achetée chez Frontier Scientific Europe (Carnforth, Angleterre). Ce travail a été réalisé par l'équipe du Docteur Bruno Therrien, à l'Université de Neuchâtel.

- Caractéristiques photophysiques

Les mesures des spectres d'absorption et de fluorescence ont été réalisées respectivement avec un spectrophotomètre double faisceau UV-visible Perkin-Elmer (Lambda EZ 210, Courtaboeuf, France) et un spectrofluorimètre Fluorolog FL3-222 (Horiba Jobin Yvon, Longjumeau, France) équipé d'une lampe à arc xénon de 450 W, d'un compartiment thermostaté (25°C), d'un photomultiplicateur UV-visible R928 (HAMAMATSU, Japon) et d'un détecteur IR InGaAs refroidi à l'azote liquide (DSS-16A020L Electro-Optical System Inc, Phoenixville, PA, USA). Le faisceau d'excitation est séparé par un monochromateur double réseau SPEX (1200 traits/mm blasé à 330 nm). La fluorescence a été mesurée par le détecteur UV-Visible *via* le monochromateur d'émission double réseau SPEX (1200 traits/mm blasé à 500 nm). La production d'oxygène singulet a été mesurée par le détecteur IR *via* le monochromateur d'émission double réseau SPEX (600 traits/mm blasé à 1 μm). Tous les spectres ont été mesurés en utilisant des cuves quartz à 4 faces. Les rendements quantiques de fluorescence ont été déterminés en utilisant comme référence une solution de tétraphényl porphyrine (TPP) dans le toluène ($\Phi_f = 0,11$ [219]). Les rendements quantiques de production d'oxygène singulet ont été déterminés en utilisant comme référence une solution de rose de Bengale dans l'éthanol ($\Phi_\Delta = 0,68$ [220]). Les valeurs d'absorption à la longueur d'onde d'excitation (415 nm) des références et des échantillons ont été ajustées à environ 0,2.

Le rendement quantique en fluorescence a été déterminé par l'équation :

$$\Phi_f = \Phi_{f_0} \times (I_f / I_{f_0}) \times (DO_o / DO) \times (n / n_o)^2$$

où Φ_f et Φ_{f_0} , I_f et I_{f_0} , DO et DO_o , n et n_o sont les rendements quantiques, les intensités de fluorescence, les densités optiques, les indices de réfraction de l'échantillon et de la référence,

respectivement.

Le rendement quantique de production d'oxygène singulet a été déterminé par l'équation : $\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta_0} \times (I / I_0) \times (DO_0 / DO)$

où Φ_{Δ} et Φ_{Δ_0} , I et I_0 , DO et DO_0 sont les rendements quantiques de production d'oxygène singulet, les intensités de production d'oxygène singulet et les densités optiques de l'échantillon et de la référence, respectivement.

Tout ce travail a été réalisé au LRGP en collaboration avec l'équipe du Dr. Céline Frochot et l'aide de Philippe Arnoux.

- Animaux et modèle tumoral

Les animaux et le modèle tumoral utilisés demeurent les mêmes que précédemment (**Conf. PARTIE III, II. 2.**).

- Traitement photodynamique des tumeurs

Le protocole d'irradiation reste comparable à celui utilisé précédemment (**Conf. PARTIE III, II. 2.**) avec une longueur d'onde fixée à 652 nm grâce à une diode laser (CeramOptec, GmbH, Bonn, Germany).

- Planification d'expériences et analyses statistiques

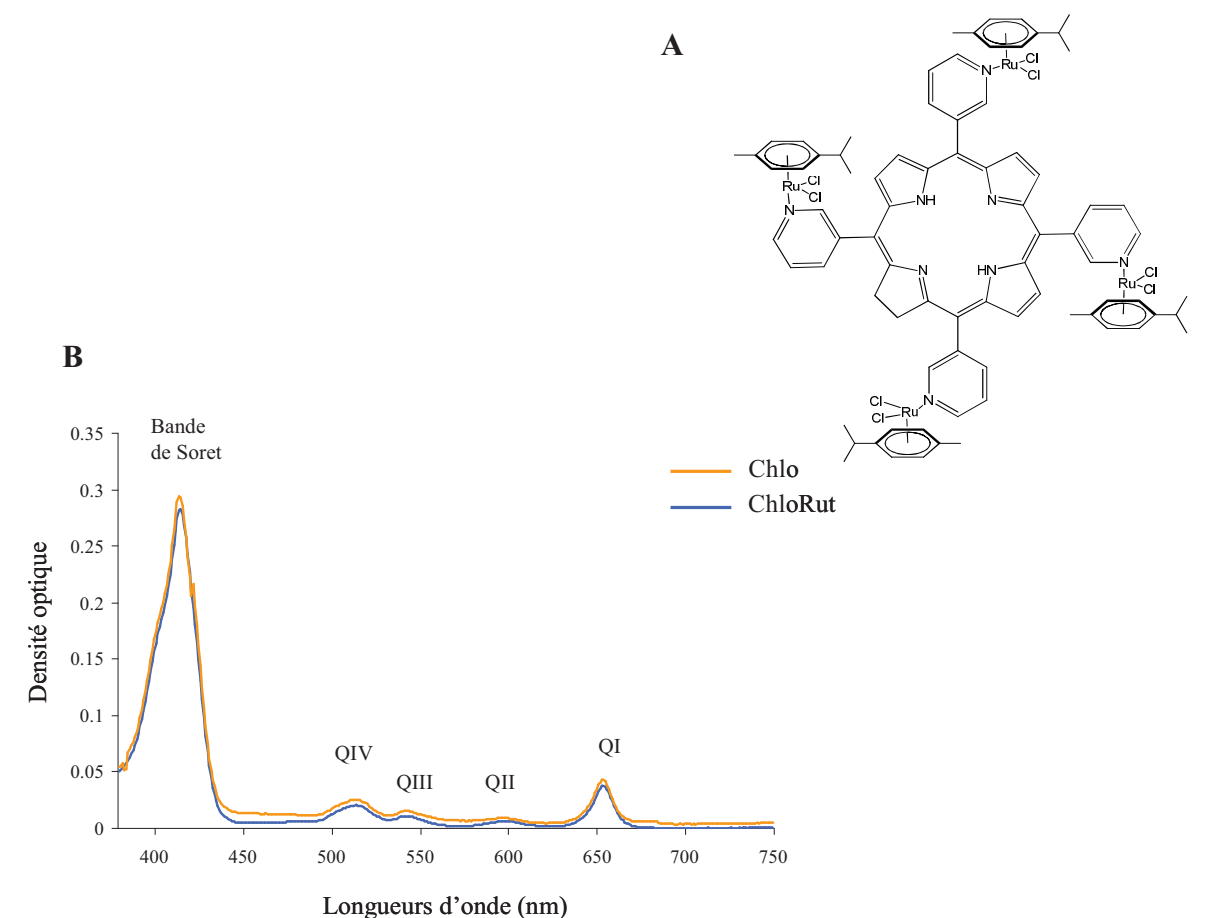
Le modèle mathématique utilisé pour cette étude est le même que celui utilisé précédemment (**Conf. PARTIE III, II. 2.**). Il a eu pour but d'optimiser les conditions optimales de traitement photodynamique pour les facteurs DLI, concentration en photosensibilisateur et fluence (**Tableau VIII**).

b. Résultats et discussion

- Caractérisation photophysique

La synthèse du composé $Ru_4(\eta^6\text{-}p\text{-Pr}^i\text{C}_6\text{H}_4\text{Me})_4(\text{tetra-3-pyridylchlorine})\text{Cl}_8$, ou ChloRut, a été décrite dans la référence [218] (**Figure 28 A**). Les spectres d'absorption des composés ChloRut et Chlo (tetra-3-pyridylchlorine) se caractérisent par une bande QI plus intense comparée à celle des porphyrines ([4], Figure 1) (**Figure 28 B**). Les valeurs des rendements quantiques de fluorescence sont relativement élevées comparées à celles de Rut4

(0,05) et leur rendement quantique de formation d' $^1\text{O}_2$ se rapproche de celui de Rut4 (0,57) (Figure 28 C). Le couplage des 4 arènes ruthénium n'a donc pas modifié les valeurs des rendements quantiques de fluorescence et d' $^1\text{O}_2$ de la chlorine.



Longueurs d'onde (nm)

C

Composés	λ_{max} (nm) (ϵ) ^{a,c}	Fluorescence λ_{max} (nm) ^{a,b}	Rendement quantique de fluorescence [Φ_F]	Rendement quantique d'oxygène singulet [$\Phi(^1\text{O}_2)$]
ChloRut	420 (69,1) 652 (19,9)	650	0,33	0,62
Chlo	420 (78,3) 652 (11,6)	650	0,34	0,54

a. Les spectres d'absorption et de fluorescence ont été mesurés dans l'EtOH

b. Le spectre de fluorescence a été mesuré après une excitation à 415 nm

c. Les coefficients d'extinction molaires (ϵ) sont exprimés en $10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

Figure 28 : A, structure moléculaire de ChloRut, $\text{Ru}_4(\eta^6\text{-}p\text{-Pr}^i\text{C}_6\text{H}_4\text{Me})_4(\text{tetra-3-pyridylchlorine})\text{Cl}_8$. B, spectres d'absorption de ChloRut (bleu) et Chlo (orange). C, Spectres d'absorption et de fluorescence (λ_{max} présentées) ont été mesurés dans l'éthanol. Les rendements quantiques de fluorescence à 416 nm [Φ_F] et d' $^1\text{O}_2$ [$\Phi(^1\text{O}_2)$] ont également été mesurés dans l'éthanol.

- Plan d'expérience

Nous avons utilisé un modèle quadratique ayant pour but de définir l'effet de synergie entre les facteurs fluence, dose de photosensibilisateur et DLI. Ainsi, nous avons étudié l'influence de ces trois facteurs : fluence, concentration en ChloRut et DLI, respectivement notés U1, U2, U3 dans le **tableau VIII**. Nous avons gardé une irradiance de 80 mW/cm².

Tableau VIII : Domaine expérimental pour l'optimisation de ChloRut.

	Facteur	Unité	Centre	Pas de variation
U1	Fluence	J/cm ²	80	70
U2	Concentration en PS	µmol/kg	1,1	0,9
U3	DLI	h	60	36

Chaque facteur peut prendre trois valeurs, définies par une valeur centrale et son pas de variation (+/-). L'élaboration d'un plan d'expérience à partir de ces facteurs a fait apparaître 13 conditions de traitement pour estimer les valeurs de synergie significatives sur la réponse tumorale et 4 conditions de traitement pour valider les valeurs obtenues dans les conditions d'estimation du modèle (**Tableau IX**). Trois souris ont été utilisées par condition, mise à part la condition 13, qui est la condition au centre des valeurs testées, répétée 10 fois.

Tableau IX : Plan d'expérience et modalités de traitement pour l'optimisation de ChloRut.

N°Exp	Nombre de répétition	Fluence	Concentration en PS	DLI	
		J/cm ²	µmol/kg	h	
1	3	150	1,1	56	Estimation
2	3	10	1,1	56	
3	3	115	2	56	
4	3	45	0,2	56	
5	3	115	0,2	56	
6	3	45	2	56	
7	3	115	1,4	96	
8	3	45	0,8	24	
9	3	115	0,8	24	
10	3	80	1,7	24	
11	3	45	1,4	96	
12	3	80	0,5	96	
13	10	80	1,1	56	
14	3	51	0,9	50	Validation
15	3	109	0,9	50	
16	3	80	1,6	50	
17	3	80	1,1	78	

Le **tableau X** représente les modalités de traitement du plan d'expérience et les valeurs moyennes d'IDGR pour chacune des conditions. Une représentation classique de courbe de croissance tumorale est présentée **Figure 29**.

Tableau X : Valeurs des différents paramètres de traitement avec ChloRut et la valeur moyenne de leur IDGR.

Exp	IDL (h)	Fluence (J/cm ²)	Concentration (μmol/kg)	P _{sortie fibre} (mW)	Tps irradiation	IDGR Y (mm/j)
1	56	150	1,1	251,2	31min 15	0,4093
2	56	10	1,1		2min 05	0,417
3	56	115	2		23min 57	0,298
4	56	45	0,2		9min 21	0,327
5	56	115	0,2		23min 57	0,322
6	56	45	2		9min 21	0,331
7	96	115	1,4		23min 57	0,317
8	24	45	0,8		9min 21	0,287
9	24	115	0,8		23min 57	0,312
10	24	80	1,7		16min 40	0,415
11	96	45	1,4		9min 21	0,313
12	96	80	0,5		16min 40	0,328
13	56	80	1,1		16min 40	0,381
14	50	51	0,9		10min 37	0,353
15	50	109	0,9		22min 42	0,425
16	50	80	1,6		16min 40	0,272
17	78	80	1,1		16min 40	0,325

On observe un effet significatif de la concentration en ChloRut sur la réponse tumorale au traitement (coeff. b2-2, **Tableau XI**).

Tableau XI : Significativité des coefficients des différents facteurs d'optimisation de ChloRut et leurs interactions

Nom	Coefficient	Ecart-Type	Signif. %
b0	16.36	0.79	< 0.01 ***
b1	1.25	0.90	17.3
b2	0.05	0.79	95.3
b3	-0.34	0.73	63.8
b1-1	0.21	1.54	89
b2-2	3.78	1.15	0.185 **
b3-3	0.80	0.98	41.9
b1-2	-0.40	1.84	83.1
b1-3	0.84	1.93	66.7
b2-3	0.77	1.67	64.8

Signification des codes: [**], p = 0,01

La réponse tumorale à la PDT est améliorée avec de faibles et de fortes concentrations en ChloRut. Toutefois, le comportement des modèles est très mal reproduit ($r^2 < 0,5$). La représentation classique des courbes de suivi de croissance tumorale illustre très bien ce comportement proche entre les différentes conditions (**Figure 26**).

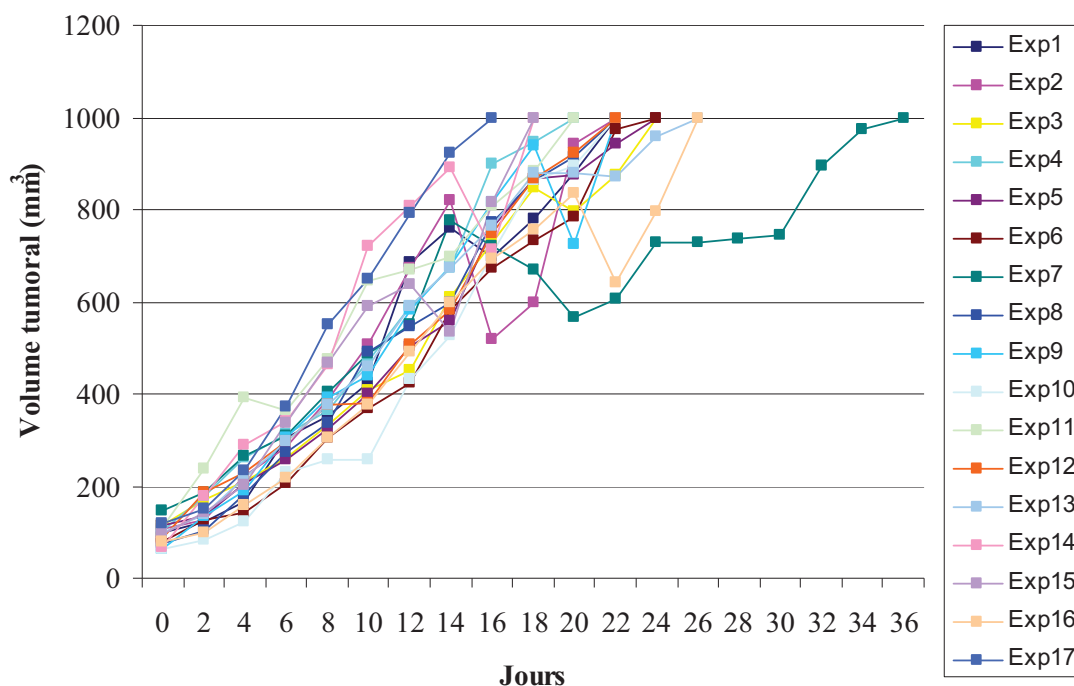


Figure 29 : Suivi post-PDT de la croissance tumorale pour chaque condition d'irradiation avec ChloRut. Volume tumoral (mm^3) en fonction du nombre de jours post-irradiation. N = 10 souris pour la condition 13, n = 3 souris pour les autres conditions.

La variabilité en terme d'efficacité entre les 17 conditions de traitement testées est très faible. Il faut donc rester prudent sur les conclusions issues de cette analyse. Le tableau de significativité des coefficients des différents facteurs et leurs interactions (**Tableau XI**) montre cependant une influence significative de la concentration ($p = 0,01$). Sa valeur positive sous-entend qu'une augmentation du retard de croissance (diminution de l'IDGR) pourrait être obtenue avec une augmentation supplémentaire de la concentration de ChloRut. Les autres paramètres fluence et IDL ne dénotent aucune influence sur la réponse tumorale post-PDT.

Pour tester l'efficacité du composé ChloRut en PDT, nous avons donc fixé la fluence à 100 J/cm^2 et l'IDL à 72 heures. L'irradiance a été maintenue à 80 mW/cm^2 . Suite aux résultats obtenus *via* de plan exploratoire, la concentration en ChloRut a été augmentée à $4 \mu\text{mol/kg}$.

2. Efficacité anti-tumorale du composé ChloRut avec les conditions optimales de traitement

a. Matériel et méthodes

- Animaux et modèle tumoral

Les animaux et le modèle tumoral utilisés ici restent les mêmes que précédemment (**Conf. PARTIE III, II. 2.**).

- Traitement par PDT des tumeurs

Le protocole de traitement photodynamique est identique à celui utilisé précédemment (**Conf. PARTIE III, II. 2.**).

- Biodistribution tumorale par spectrofluorimétrie fibrée

Les composés ChloRut et Chlo ont été injectés à la concentration de 1,75 $\mu\text{mol/kg}$ par voie i.v. chez la souris *nude* xénogreffée en ectopique avec des cellules KB. Durant les mesures, la fibre optique a été maintenue en contact direct avec la peau de la souris, au niveau de la tumeur. Les mesures ont été réalisées 3, 24, 48, 96 heures et 1 semaine après l'injection des composés. La fluorescence a été mesurée avec un spectrofluorimètre fibré construit au laboratoire. La tumeur a été excitée par un laser (Laser 2000, λ_{exc} 410 nm, $\Delta\lambda$ 3 nm) à une puissance en sortie de fibre de 300 mW. La fibre optique est composée de 3 fibres : une pour l'excitation (cœur de 550 μm), une pour collecter la fluorescence émise par les photosensibilisateurs (cœur de 200 μm) et une pour collecter la rétrodiffusion. L'émission de fluorescence est filtrée par un filtre à 500 nm. Le spectrofluorimètre (USB 2000-Ocean Optics) était connecté à un ordinateur avec un logiciel dédié à l'appareil. Pour évaluer les variations de mesure, 3 spectres ont été enregistrés par site avec un temps d'accumulation de 0,5 à 1 seconde. Ces spectres ont ensuite été moyennés. Des spectres ont également été mesurés sur la patte contro-latérale saine et ont été déduits des valeurs obtenues pour les tumeurs. L'erreur standard (S.E.) a été calculée pour les variations intra-tissulaires. 3 animaux par condition ont été testés.

- Localisation cellulaire *in vitro* par microscopie confocale

La localisation intracellulaire de ChloRut et Chlo a été étudiée avec un microscope confocal à laser Leica SP2-AOBS (Leica Microsystems, Wetzla, Germany) équipé d'un objectif x63 à immersion dans l'eau, à ouverture numérique de 1,2. Les organites cellulaires ont été marqués avec des marqueurs fluorescents spécifiques : LysoTracker (NUMBER, Invitrogen, Saint Aubin, France) à 0,2 μM pour les lysosomes, MitoTracker (NUMBER, Invitrogen) à 0,5 μM pour les mitochondries et DiOC₆ (3,3'-dihexyloxycarbocyanine iodide, NUMBER, Invitrogen) à 1 $\mu\text{g/ml}$ pour le réticulum endoplasmique. Le marquage des organites a été précédemment décrit [181]. Après 48h de croissance sur une lame Labteck-II (Dutscher, Brumath, France), les cellules KB ont été incubées 24h avec 10 μM de ChloRut ou Chlo, puis rincées 3 fois au PBS. Les cellules ont ensuite été incubées avec les différents marqueurs d'organite à la concentration et au temps d'incubation qui leur sont propres. Puis les cellules ont été rincées 3 fois au PBS. Les photosensibilisateurs et les marqueurs d'organite ont été excités avec le laser à la longueur d'onde de 488 nm. L'émission de la fluorescence des photosensibilisateurs a été récupérée dans la bande passante 630-670 nm. La fluorescence des marqueurs d'organite a été récupérée dans la bande passante 505-545 nm. Un pinhole de 60,85 μm a été utilisé et les images ont été enregistrées avec 1024 x 1024 pixels. Les mesures de fluorescence des photosensibilisateurs et des marqueurs ont été réalisées en mode séquentiel.

L'analyse des images de fluorescence a permis le calcul du coefficient de Pearson.

- Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée en appliquant le *Log-rank test*, à l'aide du logiciel StatView[®] (SAS Institute Inc, Cary, NC, USA).

b. Résultats et discussion

• Biodistribution *in vivo*

L'étude de biodistribution par spectrofluorimétrie fibrée a permis de comparer la distribution tumorale des composés ChloRut et Chlo par détection de fluorescence au niveau de la tumeur. Les composés ont été injectés par voie i.v. à la concentration de 1,75 $\mu\text{mol/kg}$. L'intensité médiane de fluorescence du composé Chlo dans la tumeur augmente jusqu'à une semaine post-injection (**Figure 30**). En revanche, cette intensité médiane de fluorescence dans la tumeur atteint un maximum à 96h pour le composé ChloRut.

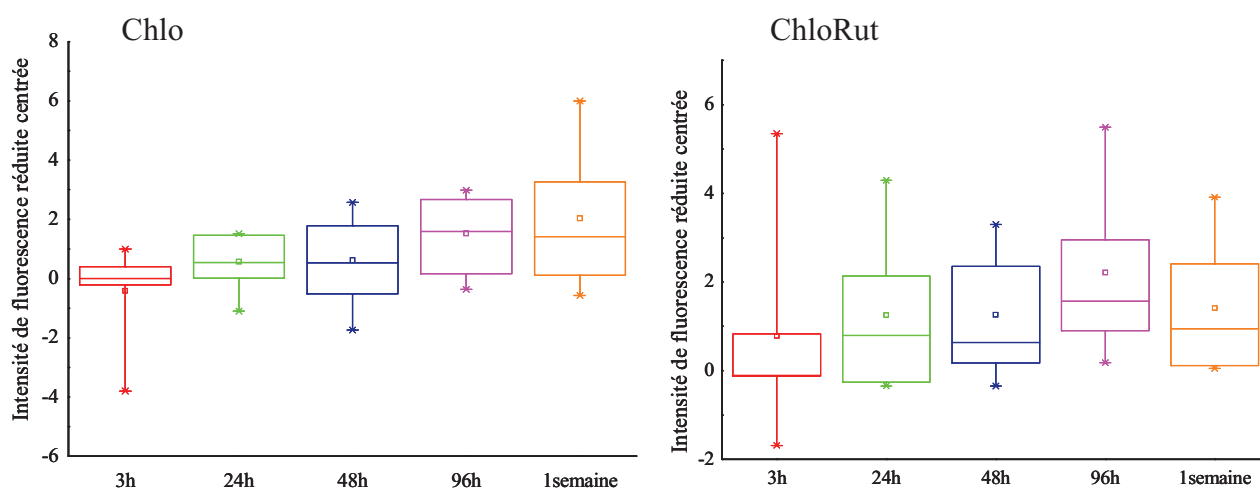


Figure 30 : Cinétique de l'intensité de fluorescence centrée réduite des composés Chlo (à gauche) et ChloRut (à droite) injectés chez la souris *nude* par voie i.v. à la dose de 1,75 $\mu\text{mol/kg}$. N = 3 souris.

La dispersion des résultats pour le conjugué est importante et, ce quelque soit le délai post-injection, ne permet pas d'observer une significativité d'accumulation entre les différents temps. Cependant, nous pouvons noter une phase d'élimination donc de clairance tumorale dès 1 semaine pour le conjugué par comparaison à la chlorure dont le taux de fluorescence continue à augmenter 1 semaine post-injection. Des résultats comparables ont été observés avec les conjugués Rut1 et Rut4 [4]. La fixation du ruthénium aux transferrines plasmatiques et son transport vers les cellules tumorales pourrait influencer l'accumulation rapide du composé ChloRut dans le tissu tumoral [221-223].

- Localisation subcellulaire des composés ChloRut et Chlo

Nous avons comparé la localisation cellulaire des composés Chlo et ChloRut dans les cellules KB en culture. La colocalisation avec les marqueurs des organites lysosomes, mitochondries et réticulum endoplasmique a été étudiée. Les composés Chlo et ChloRut ne présente pas de profil distinct de localisation au niveau des lysosomes et des mitochondries (**Figure 31 A**), en revanche, au niveau du réticulum endoplasmique, le composé ChloRut est deux fois plus concentré que le composé Chlo (**Figure 31 B et figure 32**).

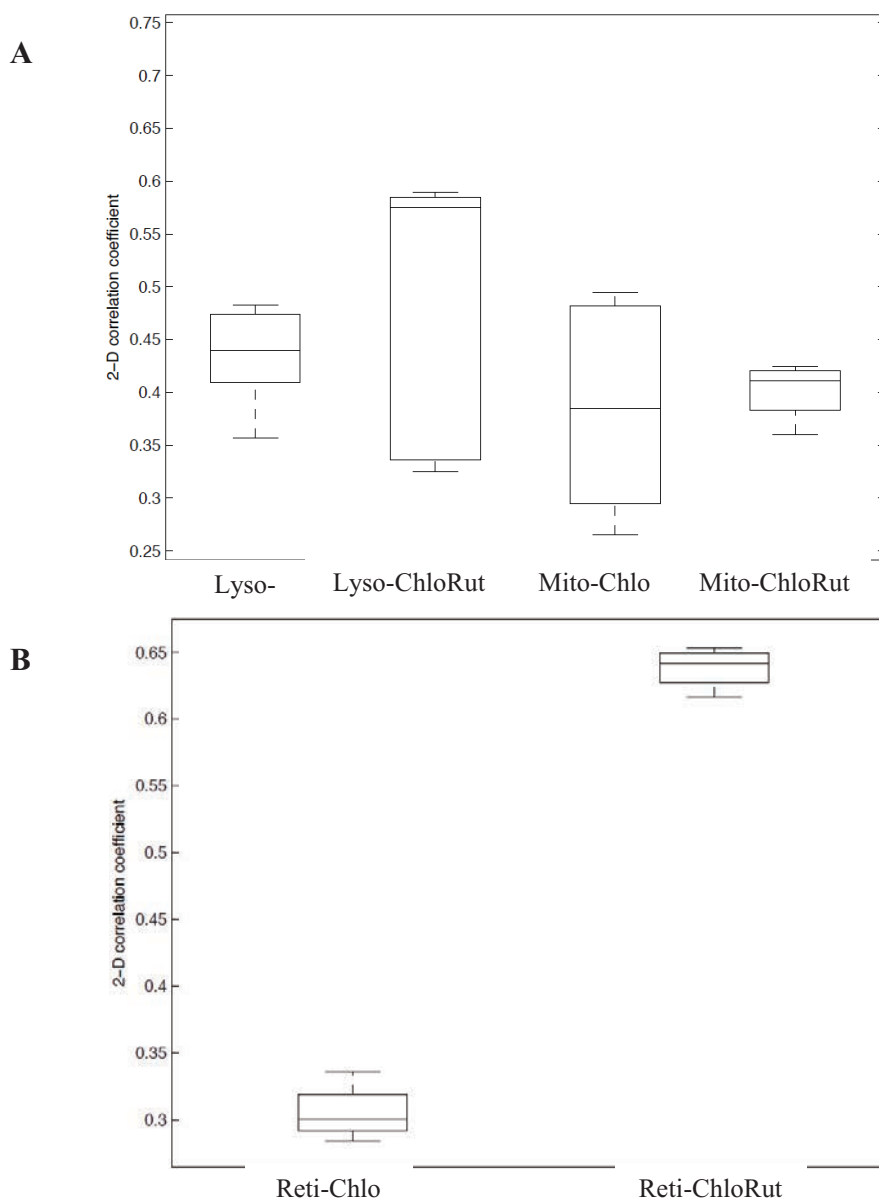


Figure 31 : Etude comparative de la localisation intracellulaire des composés Chlo et ChloRut au niveau des lysosomes (lyso, **A**), des mitochondries (mito, **A**) et du réticulum endoplasmique (reti, **B**). Ces boîtes à moustache représentent le coefficient de Pearson pour chaque condition. Les cellules KB ont été mises en contact 24h avec 10 μM de composé Chlo ou ChloRut. $\lambda_{\text{exc}} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}^{\text{photosensibilisateurs}} = 630\text{-}670 \text{ nm}$, $\lambda_{\text{em}}^{\text{organites}} = 505\text{-}545 \text{ nm}$. Objectif x63. Image de 1024 x 1024 pixels. Pinhole de 60,85 μm .

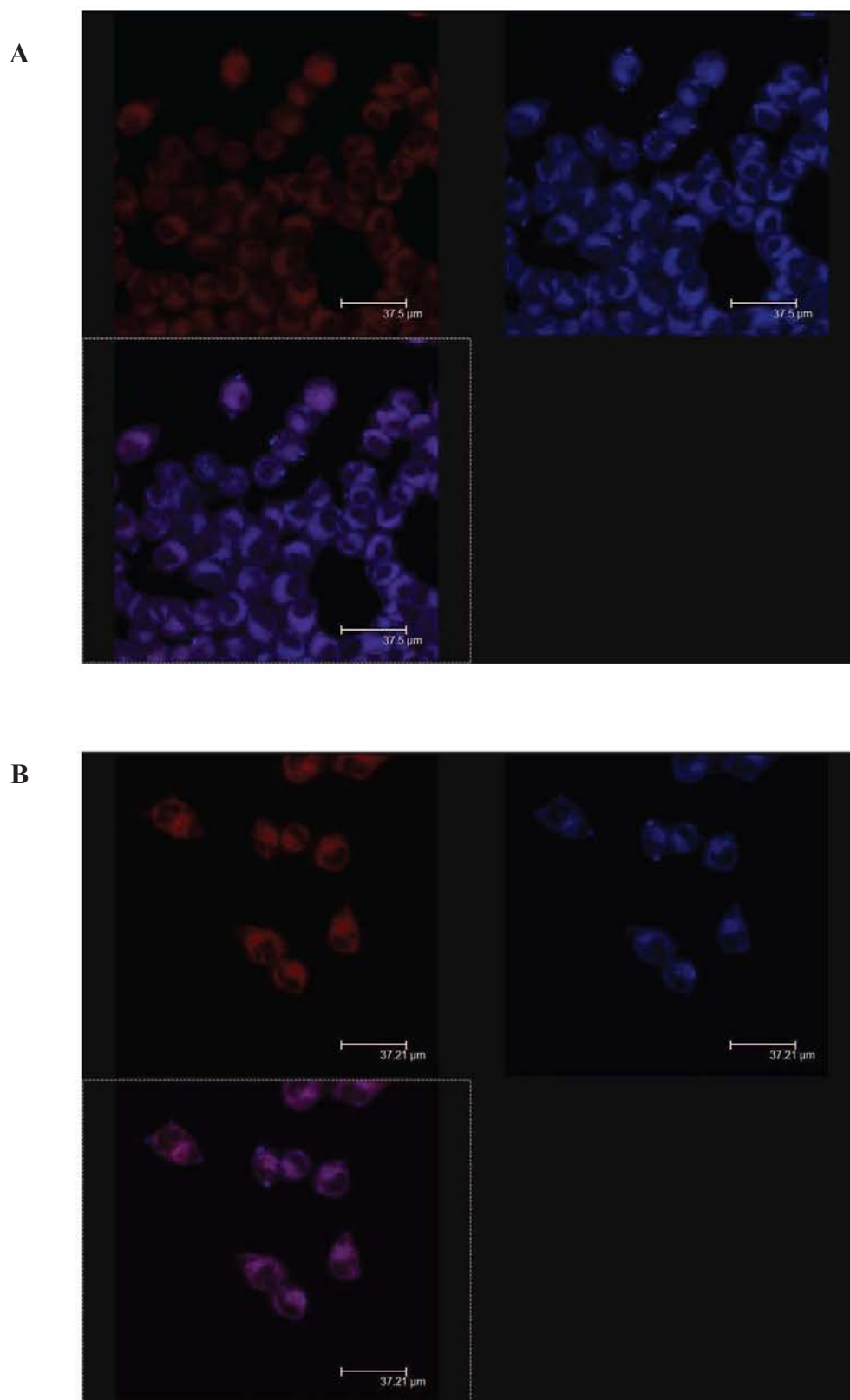


Figure 32 : Image de microscopie confocale évaluant la colocalisation cellulaire des composés Chlo et ChloRut (bleu) au niveau du réticulum-endoplasmique en utilisant un marqueur d'organite (rouge). La colocalisation des composés dans l'organite se caractérise par une fluorescence violette. Cellules KB incubées 24h avec 10 μM de Chlo (A) et de ChloRut (B). $\lambda_{exc} = 488 \text{ nm}$, $\lambda_{em \text{ photosensibilisateurs}} = 630\text{-}670 \text{ nm}$, $\lambda_{em \text{ réticulum-endoplasmique}} = 505\text{-}545 \text{ nm}$. Objectif x63. Image de 1024 x 1024 pixels. Pinhole de 60,85 μm.

- Efficacité du composé ChloRut

Nous avons étudié l'efficacité anti-tumorale du composé ChloRut en PDT avec les conditions extraites (fluence de $100\text{J}/\text{cm}^2$, irradiance de $80\text{ mW}/\text{cm}^2$, IDL de 72h et concentration en ChloRut de $4\text{ }\mu\text{mol}/\text{kg}$) par comparaison à la chlorine seule (Chlo), au ruthénium seul $[\text{Ru}(\eta^6\text{-}p\text{-Pr}^i\text{C}_6\text{H}_4\text{Me})\text{Cl}_2(\text{pyridine})]$, nommé Rut] et au groupe témoin sans traitement (**Figure 33**).

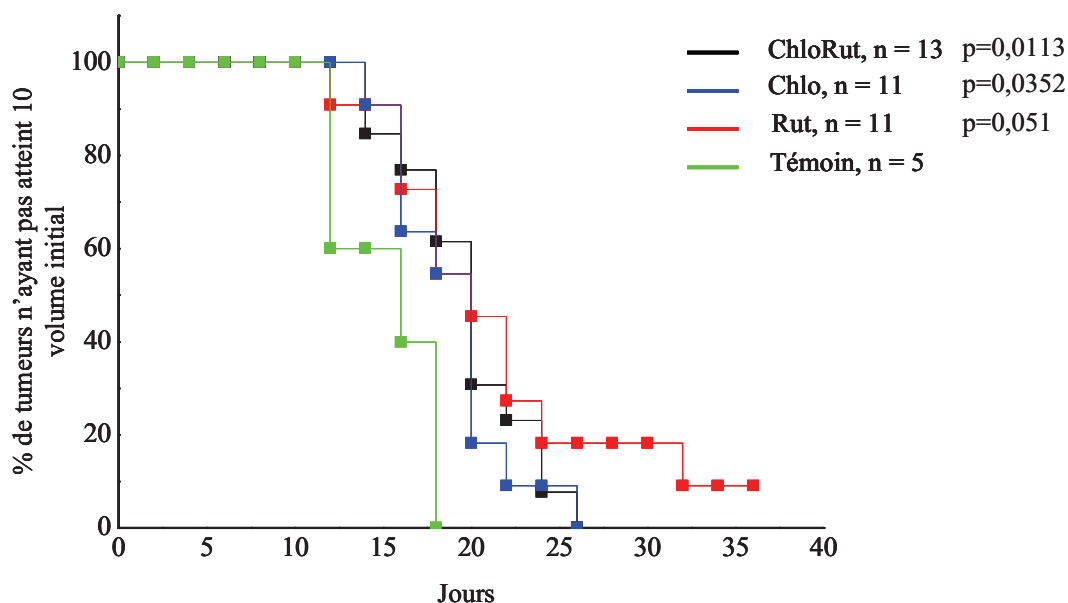


Figure 33 : Représentation de Kaplan-Meier évaluant l'efficacité anti-tumorale du composé ChloRut dans les conditions de traitement retenues du plan d'expérience et des approches expérimentales exploratoires précédentes (IDL 72h, fluence de $100\text{ J}/\text{cm}^2$, irradiance de $80\text{ mW}/\text{cm}^2$, concentration en ChloRut de $4\text{ }\mu\text{mol}/\text{kg}$). Quatre groupes sont représentés : ChloRut ($n = 13$ souris), Chlo ($n = 11$ souris), Rut pour ruthénium ($n = 11$ souris), Témoin ($n = 5$ souris). Les valeurs de p de chaque groupe sont calculées par comparaison au groupe témoin.

Pour comparer l'efficacité de la PDT avec ChloRut à celle de la PDT avec Chlo ou Rut, nous avons tracé les courbes de survie de Kaplan-Meier (**Figure 33**) en utilisant, comme paramètre de fin d'étude, le temps nécessaire pour que le volume tumoral soit multiplié par 10 par rapport au volume tumoral au moment du traitement. Les analyses statistiques ont montré un retard de croissance tumorale statistiquement significatif des groupes traités avec les composés ChloRut, Chlo et Rut ($p = 0,0113$; $0,0352$ et $0,051$; respectivement) par comparaison au groupe témoin sans traitement. La localisation intracellulaire du composé ChloRut a démontré un tropisme particulier pour le réticulum endoplasmique. Or un stress oxydatif au niveau de cet organite joue un rôle dans l'induction de l'apoptose et la cytotoxicité des agents alkylants à base de métal [31, 34, 35, 187].

IV. Synthèse générale et perspectives

En cancérologie, dans le cas de bithérapie, la PDT peut-être associée à d'autres stratégies thérapeutiques et apparaître complémentaire (*e.g.* durant la chirurgie sur les berges d'exérèse) pour améliorer l'éradication tumorale et l'efficacité du traitement. Néanmoins, un des facteurs limitant bien connu de ce traitement demeure la faible pénétration de la lumière dans les tissus. Même si de nouvelles stratégies de photo-activation sont étudiées (*e.g.* excitation en bi-photons, up-conversion), les approches expérimentales sont souvent restreintes à l'*in vitro* [204, 224-226].

En couplant une molécule photo-activable avec un agent alkylant, nous avons envisagé de combiner l'action cytotoxique du ruthénium à l'efficacité photodynamique de la porphyrine ou de la chlorine. En effet, les divers complexes de ruthénium s'affichent actuellement comme des molécules d'intérêt thérapeutique potentielles en oncologie. Les molécules NAMI-A et KP1019 ont d'ailleurs réussi avec succès l'étude clinique de phase I [227-229]. KP1019 présente une activité anti-néoplasique élevée *in vivo*, tandis que NAMI-A présente un intérêt dans l'inhibition des métastases et de l'angiogenèse [230-233]. Dans le cadre d'une approche par chimiothérapie, d'autres complexes de ruthénium sont en voie de développement [234-236].

De façon générale, les complexes de ruthénium affichent les mêmes propriétés anti-tumorales que le premier agent alkylant à base de métal largement utilisé en oncologie : le cisplatine. Ces complexes sont très connus pour leur activité nucléasique (ils coupent l'ADN) *in vitro*. Mais leur mode d'action est très diversifié [237, 238]. Certains d'entre eux interagissent avec l'ADN, et particulièrement la guanine, et provoquent son photoclivage ou la formation de photoadduits [239-242].

L'avantage de l'utilisation des complexes de ruthénium, décrit dans la littérature et étayé dans notre revue *Ruthenium : potential interest in targeting strategies for photodynamic therapy*, repose sur des effets secondaires moindres comparés à ceux du cisplatine du fait notamment de leur sélectivité tumorale élevée. En effet, le ruthénium a la capacité à se lier aux transferrines plasmatiques au niveau de leur site de liaison au fer [222, 223]. Les cellules tumorales surexpriment le récepteur à la transferrine pour augmenter leur apport en fer nécessaire à leur croissance rapide et anarchique. Les complexes de Ru(III), transportés par les transferrines jusqu'aux cellules tumorales, sont spécifiquement activés dans le cytoplasme hypoxique des cellules tumorales, par réduction en Ru(II) hautement réactif avec les

biomolécules et les membranes plasmiques [237, 243, 244]. Le ciblage nucléaire de certains complexes de ruthénium a été décrit dans la littérature, même si le taux d'incorporation nucléaire de ces complexes demeure très faible (< 1%) [245, 246]. Enfin, l'état triplet transitoire $^3\text{MCLT}$ des complexes Ru(II)polypyridyl après leur irradiation à 450 nm permet le transfert de charge du métal vers les ligands, alors capables de produire de l' $^1\text{O}_2$ à partir d' O_2 [202, 203, 247].

Les complexes porphyrine-1 arène Ru (Rut1) et porphyrine-4 arènes Ru (Rut4) étudiés dans ce travail de thèse, ont été synthétisés, caractérisés chimiquement et évalués pour leur efficacité photodynamique *in vitro* par l'équipe du Dr Bruno Therrien à l'Université de Neuchâtel [206, 207]. Ces complexes, à la concentration de 5 μM , se sont révélés phototoxiques ($\text{DL}_{50} < 0,5 \text{ J/cm}^2$ pour Rut4 et $2,5 \text{ J/cm}^2$ pour Rut1) après 24h de contact avec les cellules de mélanome humain Me300 et une irradiation à 652 nm, à 20 mW/cm^2 [207]. D'autre part, il a été démontré que le nombre d'arène ruthénium et leur position sur les cycles pyridyl influençaient l'efficacité *in vitro* de ces composés. Ces résultats prometteurs nous ont conduits et encouragés à l'évaluation pré-clinique *in vivo* de leur efficacité en PDT [4]. Ainsi, les composés Rut1 et Rut4 ont donc été sélectionnés. Un premier plan de « screening » a permis de sélectionner le composé Rut4 comme le conjugué le plus efficace en PDT avec une irradiation à 514 nm. Un IDL d'au moins 24h et une faible irradiance ont été définis comme des facteurs influents. Les conditions optimales d'irradiation du composé Rut4 ont ensuite été évaluées et testées par un plan d'expérience utilisant un modèle quadratique, révélant l'effet synergique entre une concentration élevée en Rut4 et une fluence faible. Pour améliorer la pénétration de la lumière dans les tissus, la chlorine a été substituée à la porphyrine dans le conjugué couplé à 4 arènes Ru (ChloRut). Le rendement quantique de formation d' $^1\text{O}_2$ de ce conjugué s'est révélé aussi bon que celui du composé Rut4, et le composé ChloRut a montré son efficacité *in vivo* pour la PDT. Les cinétiques de biodistribution comparative entre ChloRut et chlorine seule par spectrofluorimétrie fibrée, ont démontré une accumulation tumorale plus rapide du conjugué. D'autre part, nous avons également mis en évidence une colocalisation du conjugué ChloRut pour le réticulum endoplasmique contrairement à la chlorine seule.

Néanmoins, dans l'objectif d'approfondir l'impact de l'IDL sur l'efficacité de traitement, il serait très pertinent d'évaluer la localisation tissulaire *versus* vasculaire en intratumoral de ce conjugué car les taux plasmatiques circulants mesurés pour le Rut4 au temps

court post-injection étaient plus de 3 fois plus élevés que dans le tissu tumoral. De plus, la pharmacocinétique réalisée sur Rut4 a montré la capture importante du composé par les organes du SRE et la peau, traduisant son manque de sélectivité tumorale. Dans le but d'améliorer cette sélectivité tumorale et de réduire leur reconnaissance par le SRE, nous pourrions envisager de vectoriser nos conjugués dans une nanoparticule non biodégradable, fonctionnalisée par des molécules d'adressage, déjà étudiées par notre groupe [108, 110].

Enfin, les études de biodistribution de ChloRut par spectrofluorimétrie fibrée ont démontré la présence de chlorure dans la tumeur, et les études de pharmacocinétique classiques ont, quant à elles, montré la présence de ruthénium dans la tumeur. Même si nous pouvons émettre le postulat d'une corrélation de la localisation tumorale de ces deux composés, nous ne pouvons certifier de leur stabilité *in vivo*. Il serait alors nécessaire d'évaluer la stabilité *in vivo* du composé ChloRut.

L'application d'une irradiation fractionnée en PDT permet la réoxygénation des tissus pour une production d' $^1\text{O}_2$ améliorée [248]. Comme nous avons démontré l'intérêt d'utiliser une faible irradiance, l'approche traitement en temps-réel par suivi du photoblanchiment représente une perspective de premier plan.

Même si notre composé ChloRut a montré son intérêt dans le cadre de notre stratégie, il serait intéressant de modifier le complexe de ruthénium utilisé dans nos composés par d'autres complexes très producteurs d' $^1\text{O}_2$, tels que le $\text{Ru}(\text{bipyridyl})_3$ dont le rendement quantique de formation d' $^1\text{O}_2$ s'élève à 0,86 dans le méthanol [202].

Références bibliographiques

- [1] M. Pernot, C. Frochot, R. Vanderesse, M. Barberi-Heyob, Targeting strategies in photodynamic therapy for cancer treatment, in: M. Hamblin, Mroz, P. (Eds.), *Advances in photodynamic therapy II*, Artech House, Boston, 2012.
- [2] M. Pernot, R. Vanderesse, C. Frochot, F. Guillemain, M. Barberi-Heyob, Stability of peptides and therapeutic success in cancer, *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 7 (2011) 793-802.
- [3] N. Thomas, M. Pernot, R. Vanderesse, P. Becuwe, E. Kamarulzaman, D. Da Silva, A. Francois, C. Frochot, F. Guillemain, M. Barberi-Heyob, Photodynamic therapy targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides with improved stability properties, *Biochem Pharmacol* 80 (2010) 226-235.
- [4] M. Pernot, T. Bastogne, N. Barry, B. Therrien, G. Koellensperger, S. Hann, V. Reshetov, M. Barberi-Heyob, Systems biology approach for in vivo photodynamic therapy optimization of ruthenium-porphyrin compounds, *Journal of Photochemistry and Photobiology B* under press (2012).
- [5] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, Photodynamic therapy, *J Natl Cancer Inst* 90 (1998) 889-905.
- [6] M.J. Davies, Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen, *Photochem Photobiol Sci* 3 (2004) 17-25.
- [7] I.E. Kochevar, M.C. Lynch, S. Zhuang, C.R. Lambert, Singlet oxygen, but not oxidizing radicals, induces apoptosis in HL-60 cells, *Photochem Photobiol* 72 (2000) 548-553.
- [8] D.A. Bellnier, W.R. Greco, H. Nava, G.M. Loewen, A.R. Oseroff, T.J. Dougherty, Mild skin photosensitivity in cancer patients following injection of Photochlor (2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a; HPPH) for photodynamic therapy, *Cancer Chemother Pharmacol* 57 (2006) 40-45.
- [9] M. Gaal, S. Otrosinka, E. Baltas, H. Ocsai, J. Olah, L. Kemeny, R. Gyulai, Photodynamic therapy of non-melanoma skin cancer with methyl aminolaevulinate is associated with less pain than with aminolaevulinic acid, *Acta Derm Venereol* 92 (2012) 173-175.
- [10] A.E. O'Connor, W.M. Gallagher, A.T. Byrne, Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy, *Photochem Photobiol* 85 (2009) 1053-1074.
- [11] R.L. Lipson, E.J. Baldes, The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative, *Arch Dermatol* 82 (1960) 508-516.
- [12] T.J. Dougherty, T.S. Mang, Characterization of intra-tumoral porphyrin following injection of hematoporphyrin derivative or its purified component, *Photochem Photobiol* 46 (1987) 67-70.
- [13] M. Zeisser-Labouebe, M. Mattiuzzo, N. Lange, R. Gurny, F. Delie, Quenching-induced deactivation of photosensitizer by nanoencapsulation to improve phototherapy of cancer, *J Drug Target* 17 (2009) 619-626.
- [14] S.B. Brown, E.A. Brown, I. Walker, The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment, *Lancet Oncol* 5 (2004) 497-508.
- [15] S. Bonneau, C. Vever-Bizet, H. Mojzisoava, D. Brault, Tetrapyrrole-photosensitizers vectorization and plasma LDL: a physico-chemical approach, *Int J Pharm* 344 (2007) 78-87.
- [16] V. Huntosova, L. Alvarez, L. Bryndzova, Z. Nadova, D. Jancura, L. Buriankova, S. Bonneau, D. Brault, P. Miskovsky, F. Sureau, Interaction dynamics of hypericin with low-density lipoproteins and U87-MG cells, *Int J Pharm* 389 (2010) 32-40.

- [17] S. Kascakova, Z. Nadova, A. Mateasik, J. Mikes, V. Huntosova, M. Refregiers, F. Sureau, J.C. Maurizot, P. Miskovsky, D. Jancura, High level of low-density lipoprotein receptors enhance hypericin uptake by U-87 MG cells in the presence of LDL, *Photochem Photobiol* 84 (2008) 120-127.
- [18] P. Mukherjee, R. Adhikary, M. Halder, J.W. Petrich, P. Miskovsky, Accumulation and interaction of hypericin in low-density lipoprotein--a photophysical study, *Photochem Photobiol* 84 (2008) 706-712.
- [19] B. Ruffell, N.I. Affara, L.M. Coussens, Differential macrophage programming in the tumor microenvironment, *Trends Immunol* 33 (2012) 119-126.
- [20] F. Danhier, O. Feron, V. Preat, To exploit the tumor microenvironment: Passive and active tumor targeting of nanocarriers for anti-cancer drug delivery, *J Control Release* 148 (2010) 135-146.
- [21] B. Cunderlikova, O. Kaalhus, R. Cunderlik, A. Mateasik, J. Moan, M. Kongshaug, pH-dependent modification of lipophilicity of porphyrin-type photosensitizers, *Photochem Photobiol* 79 (2004) 242-247.
- [22] M. Goutayer, Nano-émulsions pour la vectorisation d'agents thérapeutiques ou diagnostiques ; étude de la biodistribution par imagerie de fluorescence in vivo, Université Pierre et Marie Curie, Paris, 2008.
- [23] R. Goldsby, T. Kindt, *Immunologie. Le cours de Janis Kuby*, 2003.
- [24] J. Piette, C. Volanti, A. Vantieghem, J.Y. Matroule, Y. Habraken, P. Agostinis, Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers, *Biochem Pharmacol* 66 (2003) 1651-1659.
- [25] M. Korbelik, Induction of tumor immunity by photodynamic therapy, *J Clin Laser Med Surg* 14 (1996) 329-334.
- [26] A. Castano, T. Demidova, M. Hamblin, Mechanisms in photodynamic therapy: Part two - Cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death, *Photodiagn. Photodyn. Ther.* 2 (2005) 1-23.
- [27] G. Lavie, C. Kaplinsky, A. Toren, I. Aizman, D. Meruelo, Y. Mazur, M. Mandel, A photodynamic pathway to apoptosis and necrosis induced by dimethyl tetrahydroxyhelianthone and hypericin in leukaemic cells: possible relevance to photodynamic therapy, *Br J Cancer* 79 (1999) 423-432.
- [28] D. Kessel, R.D. Poretz, Sites of photodamage induced by photodynamic therapy with a chlorin e6 triacetoxymethyl ester (CAME), *Photochem Photobiol* 71 (2000) 94-96.
- [29] J. Mikes, J. Kleban, V. Sackova, V. Horvath, E. Jamborova, A. Vaculova, A. Kozubik, J. Hofmanova, P. Fedorocko, Necrosis predominates in the cell death of human colon adenocarcinoma HT-29 cells treated under variable conditions of photodynamic therapy with hypericin, *Photochem Photobiol Sci* 6 (2007) 758-766.
- [30] J. He, N. Oleinick, Cell death mechanisms vary with photodynamic therapy dose and photosensitizer, in: C. DA (Ed.), 5th international photodynamic association meeting, Amelia Island Floride, 1995, pp. 92-96.
- [31] A. Francois, S. Marchal, F. Guillemin, L. Bezdetsnaya, mTHPC-based photodynamic therapy induction of autophagy and apoptosis in cultured cells in relation to mitochondria and endoplasmic reticulum stress, *Int J Oncol* 39 (2011) 1537-1543.
- [32] A. Sasnauskiene, J. Kadziauskas, N. Vezelyte, V. Jonusiene, V. Kirveliene, Apoptosis, autophagy and cell cycle arrest following photodamage to mitochondrial interior, *Apoptosis* 14 (2009) 276-286.
- [33] R.L. Morris, K. Azizuddin, M. Lam, J. Berlin, A.L. Nieminen, M.E. Kenney, A.C. Samia, C. Burda, N.L. Oleinick, Fluorescence resonance energy transfer reveals a

- binding site of a photosensitizer for photodynamic therapy, *Cancer Res* 63 (2003) 5194-5197.
- [34] I. Moserova, J. Kralova, Role of ER stress response in photodynamic therapy: ROS generated in different subcellular compartments trigger diverse cell death pathways, *PLoS One* 7 (2012) e32972.
- [35] S. Marchal, A. Francois, D. Dumas, F. Guillemin, L. Bezdetnaya, Relationship between subcellular localisation of Foscan and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells, *Br J Cancer* 96 (2007) 944-951.
- [36] N. Ahmad, S. Gupta, D.K. Feyes, H. Mukhtar, Involvement of Fas (APO-1/CD-95) during photodynamic-therapy-mediated apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells, *J Invest Dermatol* 115 (2000) 1041-1046.
- [37] P. Bernardi, S. Vassanelli, P. Veronese, R. Colonna, I. Szabo, M. Zoratti, Modulation of the mitochondrial permeability transition pore. Effect of protons and divalent cations, *J Biol Chem* 267 (1992) 2934-2939.
- [38] B. Levine, J. Yuan, Autophagy in cell death: an innocent convict?, *J Clin Invest* 115 (2005) 2679-2688.
- [39] M. Andrzejak, M. Price, D.H. Kessel, Apoptotic and autophagic responses to photodynamic therapy in 1c1c7 murine hepatoma cells, *Autophagy* 7 (2011) 979-984.
- [40] R. Scherz-Shouval, Z. Elazar, Regulation of autophagy by ROS: physiology and pathology, *Trends Biochem Sci* 36 (2011) 30-38.
- [41] L. Li, G. Ishdorj, S.B. Gibson, Reactive oxygen species regulation of autophagy in cancer: Implications for cancer treatment, *Free Radic Biol Med* (2012).
- [42] D.J. Kurz, S. Decary, Y. Hong, E. Trivier, A. Akhmedov, J.D. Erusalimsky, Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells, *J Cell Sci* 117 (2004) 2417-2426.
- [43] C. Xia, Y. Wang, W. Chen, W. Yu, B. Wang, T. Li, New hydrophilic/lipophilic tetra-alpha-(4-carboxyphenoxy) phthalocyanine zinc-mediated photodynamic therapy inhibits the proliferation of human hepatocellular carcinoma Bel-7402 cells by triggering apoptosis and arresting cell cycle, *Molecules* 16 (2011) 1389-1401.
- [44] S. Rello-Varona, J.C. Stockert, M. Canete, P. Acedo, A. Villanueva, Mitotic catastrophe induced in HeLa cells by photodynamic treatment with Zn(II)-phthalocyanine, *Int J Oncol* 32 (2008) 1189-1196.
- [45] S.L. Haywood-Small, D.I. Vernon, J. Griffiths, J. Schofield, S.B. Brown, Phthalocyanine-mediated photodynamic therapy induces cell death and a G0/G1 cell cycle arrest in cervical cancer cells, *Biochem Biophys Res Commun* 339 (2006) 569-576.
- [46] J. Shao, J. Xue, Y. Dai, H. Liu, N. Chen, L. Jia, J. Huang, Inhibition of human hepatocellular carcinoma HepG2 by phthalocyanine photosensitizer PHOTOCYANINE: ROS production, apoptosis, cell cycle arrest, *Eur J Cancer* 48 (2012) 2086-2096.
- [47] X.Y. He, R.A. Sikes, S. Thomsen, L.W. Chung, S.L. Jacques, Photodynamic therapy with photofrin II induces programmed cell death in carcinoma cell lines, *Photochem Photobiol* 59 (1994) 468-473.
- [48] B.B. Noodt, K. Berg, T. Stokke, Q. Peng, J.M. Nesland, Apoptosis and necrosis induced with light and 5-aminolaevulinic acid-derived protoporphyrin IX, *Br J Cancer* 74 (1996) 22-29.
- [49] D.J. Granville, B.M. McManus, D.W. Hunt, Photodynamic therapy: shedding light on the biochemical pathways regulating porphyrin-mediated cell death, *Histol Histopathol* 16 (2001) 309-317.

- [50] D. Kessel, Y. Luo, Cells in cryptophycin-induced cell-cycle arrest are susceptible to apoptosis, *Cancer Lett* 151 (2000) 25-29.
- [51] B. Chen, B.W. Pogue, P.J. Hoopes, T. Hasan, Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy, *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 16 (2006) 279-305.
- [52] D. Bechet, L. Tirand, B. Faivre, F. Plenat, C. Bonnet, T. Bastogne, C. Frochot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Neuropilin-1 targeting photosensitization-induced early stages of thrombosis via tissue factor release, *Pharm Res* 27 (2010) 468-479.
- [53] V.H. Fingar, K.A. Siegel, T.J. Wieman, K.W. Doak, The effects of thromboxane inhibitors on the microvascular and tumor response to photodynamic therapy, *Photochem Photobiol* 58 (1993) 393-399.
- [54] N. Thomas, D. Bechet, P. Becuwe, L. Tirand, R. Vanderesse, C. Frochot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer binds neuropilin-1 in vitro and in vivo, *J Photochem Photobiol B* 96 (2009) 101-108.
- [55] M.J. Gilissen, L.E. van de Merbel-de Wit, W.M. Star, J.F. Koster, W. Sluiter, Effect of photodynamic therapy on the endothelium-dependent relaxation of isolated rat aortas, *Cancer Res* 53 (1993) 2548-2552.
- [56] B. Krammer, Vascular effects of photodynamic therapy, *Anticancer Res* 21 (2001) 4271-4277.
- [57] V.H. Fingar, S.W. Taber, P.S. Haydon, L.T. Harrison, S.J. Kempf, T.J. Wieman, Vascular damage after photodynamic therapy of solid tumors: a view and comparison of effect in pre-clinical and clinical models at the University of Louisville, *In Vivo* 14 (2000) 93-100.
- [58] R. Bhuvaneswari, Y.Y. Gan, K.C. Soo, M. Olivo, The effect of photodynamic therapy on tumor angiogenesis, *Cell Mol Life Sci* 66 (2009) 2275-2283.
- [59] U. Schmidt-Erfurth, T. Hasan, Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration, *Surv Ophthalmol* 45 (2000) 195-214.
- [60] S.O. Gollnick, S.S. Evans, H. Baumann, B. Owczarczak, P. Maier, L. Vaughan, W.C. Wang, E. Unger, B.W. Henderson, Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation, *Br J Cancer* 88 (2003) 1772-1779.
- [61] N. Yamamoto, S. Homma, T.W. Sery, L.A. Donoso, J.K. Hooper, Photodynamic immunopotential: in vitro activation of macrophages by treatment of mouse peritoneal cells with haematoporphyrin derivative and light, *Eur J Cancer* 27 (1991) 467-471.
- [62] Z. Chen, P.S. Malhotra, G.R. Thomas, F.G. Ondrey, D.C. Duffey, C.W. Smith, I. Enamorado, N.T. Yeh, G.S. Kroog, S. Rudy, L. McCullagh, S. Mousa, M. Quezado, L.L. Herscher, C. Van Waes, Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer, *Clin Cancer Res* 5 (1999) 1369-1379.
- [63] S. Schreiber, S. Gross, A. Brandis, A. Harmelin, V. Rosenbach-Belkin, A. Scherz, Y. Salomon, 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* 99 (2002) 279-285.
- [64] R. Ritz, R. Daniels, S. Noell, G.C. Feigl, V. Schmidt, A. Bornemann, K. Ramina, D. Mayer, K. Dietz, W.S. Strauss, M. Tatagiba, Hypericin for visualization of high grade gliomas: first clinical experience, *Eur J Surg Oncol* 38 (2012) 352-360.
- [65] N. Sekkat, H. van den Bergh, T. Nyokong, N. Lange, Like a bolt from the blue: phthalocyanines in biomedical optics, *Molecules* 17 (2011) 98-144.
- [66] R.R. Allison, V.S. Bagnato, R. Cuenca, G.H. Downie, C.H. Sibata, The future of photodynamic therapy in oncology, *Future Oncol* 2 (2006) 53-71.

- [67] C. Abels, Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT), *Photochem Photobiol Sci* 3 (2004) 765-771.
- [68] W.M. Sharman, C.M. Allen, J.E. van Lier, Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications, *Drug Discov Today* 4 (1999) 507-517.
- [69] M.O. Senge, J.C. Brandt, Temoporfin (Foscan(R), 5,10,15,20-tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)--a second-generation photosensitizer, *Photochem Photobiol* 87 (2011) 1240-1296.
- [70] H.B. Ris, H.J. Altermatt, R. Inderbitzi, R. Hess, B. Nachbur, J.C. Stewart, Q. Wang, C.K. Lim, R. Bonnett, M.C. Berenbaum, et al., Photodynamic therapy with chlorins for diffuse malignant mesothelioma: initial clinical results, *Br J Cancer* 64 (1991) 1116-1120.
- [71] A. Molinari, C. Bombelli, S. Mannino, A. Stringaro, L. Toccaceli, A. Calcabrini, M. Colone, A. Mangiola, G. Maira, P. Luciani, G. Mancini, G. Arancia, m-THPC-mediated photodynamic therapy of malignant gliomas: assessment of a new transfection strategy, *Int J Cancer* 121 (2007) 1149-1155.
- [72] G. Phan, A. Herbet, S. Cholet, H. Benech, J.R. Deverre, E. Fattal, Pharmacokinetics of DTPA entrapped in conventional and long-circulating liposomes of different size for plutonium decorporation, *J Control Release* 110 (2005) 177-188.
- [73] V.D. Awasthi, D. Garcia, B.A. Goins, W.T. Phillips, Circulation and biodistribution profiles of long-circulating PEG-liposomes of various sizes in rabbits, *Int J Pharm* 253 (2003) 121-132.
- [74] J. Fang, H. Nakamura, H. Maeda, The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect, *Adv Drug Deliv Rev* 63 (2011) 136-151.
- [75] C.S. Jin, G. Zheng, Liposomal nanostructures for photosensitizer delivery, *Lasers Surg Med* 43 (2011) 734-748.
- [76] N. Dragicevic-Curic, D. Scheglmann, V. Albrecht, A. Fahr, Development of liposomes containing ethanol for skin delivery of temoporfin: characterization and in vitro penetration studies, *Colloids Surf B Biointerfaces* 74 (2009) 114-122.
- [77] N. Nombona, K. Maduray, E. Antunes, A. Karsten, T. Nyokong, Synthesis of phthalocyanine conjugates with gold nanoparticles and liposomes for photodynamic therapy, *J Photochem Photobiol B* 107 (2012) 35-44.
- [78] H.P. Lassalle, M. Wagner, L. Bezdetnaya, F. Guillemin, H. Schneckenburger, Fluorescence imaging of Foscan and Foslip in the plasma membrane and in whole cells, *J Photochem Photobiol B* 92 (2008) 47-53.
- [79] F. Postigo, M. Mora, M.A. De Madariaga, S. Nonell, M.L. Sagrista, Incorporation of hydrophobic porphyrins into liposomes: characterization and structural requirements, *Int J Pharm* 278 (2004) 239-254.
- [80] A.M. Garcia, E. Alarcon, M. Munoz, J.C. Scaiano, A.M. Edwards, E. Lissi, Photophysical behaviour and photodynamic activity of zinc phthalocyanines associated to liposomes, *Photochem Photobiol Sci* 10 (2011) 507-514.
- [81] T. Kosobe, E. Moriyama, Y. Tokuoka, N. Kawashima, Size and surface charge effect of 5-aminolevulinic acid-containing liposomes on photodynamic therapy for cultivated cancer cells, *Drug Dev Ind Pharm* 31 (2005) 623-629.
- [82] M. Nisnevitch, F. Nakonechny, Y. Nitzan, Photodynamic antimicrobial chemotherapy by liposome-encapsulated water-soluble photosensitizers, *Bioorg Khim* 36 (2010) 396-402.
- [83] H.M. Patel, N.S. Tuzel, B.E. Ryman, Inhibitory effect of cholesterol on the uptake of liposomes by liver and spleen, *Biochim Biophys Acta* 761 (1983) 142-151.

- [84] T.M. Allen, A study of phospholipid interactions between high-density lipoproteins and small unilamellar vesicles, *Biochim Biophys Acta* 640 (1981) 385-397.
- [85] A. Gabizon, D. Papahadjopoulos, The role of surface charge and hydrophilic groups on liposome clearance in vivo, *Biochim Biophys Acta* 1103 (1992) 94-100.
- [86] M.S. Hong, S.J. Lim, Y.K. Oh, C.K. Kim, pH-sensitive, serum-stable and long-circulating liposomes as a new drug delivery system, *J Pharm Pharmacol* 54 (2002) 51-58.
- [87] K. Ichikawa, T. Hikita, N. Maeda, Y. Takeuchi, Y. Namba, N. Oku, PEGylation of liposome decreases the susceptibility of liposomal drug in cancer photodynamic therapy, *Biol Pharm Bull* 27 (2004) 443-444.
- [88] M.J. Bovis, J.H. Woodhams, M. Loizidou, D. Scheglmann, S.G. Bown, A.J. MacRobert, Improved in vivo delivery of m-THPC via pegylated liposomes for use in photodynamic therapy, *J Control Release* 157 (2012) 196-205.
- [89] A.S. Derycke, P.A. de Witte, Liposomes for photodynamic therapy, *Adv Drug Deliv Rev* 56 (2004) 17-30.
- [90] E.A. Leite, A.M. Lana, A.D. Junior, L.G. Coelho, M.C. De Oliveira, Acute toxicity study of cisplatin loaded long-circulating and pH-sensitive liposomes administered in mice, *J Biomed Nanotechnol* 8 (2012) 229-239.
- [91] G.J. Charrois, T.M. Allen, Rate of biodistribution of STEALTH liposomes to tumor and skin: influence of liposome diameter and implications for toxicity and therapeutic activity, *Biochim Biophys Acta* 1609 (2003) 102-108.
- [92] T.L. Andresen, D.H. Thompson, T. Kaasgaard, Enzyme-triggered nanomedicine: drug release strategies in cancer therapy, *Mol Membr Biol* 27 (2010) 353-363.
- [93] A. Yavlovich, B. Smith, K. Gupta, R. Blumenthal, A. Puri, Light-sensitive lipid-based nanoparticles for drug delivery: design principles and future considerations for biological applications, *Mol Membr Biol* 27 (2010) 364-381.
- [94] L.A. Tai, Y.C. Wang, C.S. Yang, Heat-activated sustaining nitric oxide release from zwitterionic diazeniumdiolate loaded in thermo-sensitive liposomes, *Nitric Oxide* 23 (2010) 60-64.
- [95] S.L. Gosangari, K.L. Watkin, Enhanced release of anticancer agents from nanoliposomes in response to diagnostic ultrasound energy levels, *Pharm Dev Technol* 17 (2012) 383-388.
- [96] A.R. Tall, I. Tabas, K.J. Williams, Lipoprotein-liposome interactions, *Methods Enzymol* 128 (1986) 647-657.
- [97] T. Ishida, H. Harashima, H. Kiwada, Liposome clearance, *Biosci Rep* 22 (2002) 197-224.
- [98] D. Bechet, P. Couleaud, C. Frochot, M.L. Viriot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents, *Trends Biotechnol* 26 (2008) 612-621.
- [99] R. Chouikrat, A. Seve, R. Vanderesse, H. Benachour, M. Barberi-Heyob, S. Richeter, L. Raehm, J.O. Durand, M. Verelst, C. Frochot, Non polymeric nanoparticles for photodynamic therapy applications: recent developments, *Curr Med Chem* 19 (2012) 781-792.
- [100] F. Danhier, E. Ansorena, J.M. Silva, R. Coco, A. Le Breton, V. Preat, PLGA-based nanoparticles: an overview of biomedical applications, *J Control Release* 161 (2012) 505-522.
- [101] M. Korbelik, R. Madiyalakan, T. Woo, A. Haddadi, Antitumor efficacy of photodynamic therapy using novel nanoformulations of hypocrellin photosensitizer SL052, *Photochem Photobiol* 88 (2012) 188-193.

- [102] V. Klepac-Ceraj, N. Patel, X. Song, C. Holewa, C. Patel, R. Kent, M.M. Amiji, N.S. Soukos, Photodynamic effects of methylene blue-loaded polymeric nanoparticles on dental plaque bacteria, *Lasers Surg Med* 43 (2011) 600-606.
- [103] J.R. McCarthy, J.M. Perez, C. Bruckner, R. Weissleder, Polymeric nanoparticle preparation that eradicates tumors, *Nano Lett* 5 (2005) 2552-2556.
- [104] M. Fadel, K. Kassab, D.A. Fadeel, Zinc phthalocyanine-loaded PLGA biodegradable nanoparticles for photodynamic therapy in tumor-bearing mice, *Lasers Med Sci* 25 (2010) 283-272.
- [105] Z. Hu, Y. Pan, J. Wang, J. Chen, J. Li, L. Ren, Meso-tetra (carboxyphenyl) porphyrin (TCPP) nanoparticles were internalized by SW480 cells by a clathrin-mediated endocytosis pathway to induce high photocytotoxicity, *Biomed Pharmacother* 63 (2009) 155-164.
- [106] E. Ricci-Junior, J.M. Marchetti, Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use, *Int J Pharm* 310 (2006) 187-195.
- [107] O. Bourdon, I. Laville, D. Carrez, A. Croisy, P. Fedel, A. Kasselouri, P. Prognon, P. Legrand, J. Blais, Biodistribution of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin incorporated into surface-modified nanocapsules in tumor-bearing mice, *Photochem Photobiol Sci* 1 (2002) 709-714.
- [108] P. Couleaud, D. Bechet, R. Vanderesse, M. Barberi-Heyob, A.C. Faure, S. Roux, O. Tillement, S. Porhel, F. Guillemain, C. Frochot, Functionalized silica-based nanoparticles for photodynamic therapy, *Nanomedicine (Lond)* 6 (2011) 995-1009.
- [109] Y.E. Koo, G.R. Reddy, M. Bhojani, R. Schneider, M.A. Philbert, A. Rehemtulla, B.D. Ross, R. Kopelman, Brain cancer diagnosis and therapy with nanoplatforms, *Adv Drug Deliv Rev* 58 (2006) 1556-1577.
- [110] D. Bechet, C. Frochot, R. Vanderesse, M. Barberi-Heyob, Innovations of photodynamic therapy for brain tumors: potential of multifunctional nanoparticles, *J. Carcinogene Mutagene* under press (2012).
- [111] J. Funkhouser, Reinventing pharma: The theranostic revolution, *Curr Drug Discov* 2 (2002) 17-19.
- [112] S.S. Kelkar, T.M. Reineke, Theranostics: combining imaging and therapy, *Bioconjug Chem* 22 (2011) 1879-1903.
- [113] J.R. McCarthy, The future of theranostic nanoagents, *Nanomedicine (Lond)* 4 (2009) 693-695.
- [114] W. Tang, H. Xu, E.J. Park, M.A. Philbert, R. Kopelman, Encapsulation of methylene blue in polyacrylamide nanoparticle platforms protects its photodynamic effectiveness, *Biochem Biophys Res Commun* 369 (2008) 579-583.
- [115] M. Gary-Bobo, O. Hocine, D. Brevet, M. Maynadier, L. Raehm, S. Richeter, V. Charasson, B. Loock, A. Morere, P. Maillard, M. Garcia, J.O. Durand, Cancer therapy improvement with mesoporous silica nanoparticles combining targeting, drug delivery and PDT, *Int J Pharm* 423 (2012) 509-515.
- [116] K. Zaruba, J. Kralova, P. Rezanka, P. Pouckova, L. Veverkova, V. Kral, Modified porphyrin-brucine conjugated to gold nanoparticles and their application in photodynamic therapy, *Org Biomol Chem* 8 (2010) 3202-3206.
- [117] S. Balivada, R.S. Rachakatla, H. Wang, T.N. Samarakoon, R.K. Dani, M. Pyle, F.O. Kroh, B. Walker, X. Leaym, O.B. Koper, M. Tamura, V. Chikan, S.H. Bossmann, D.L. Troyer, A/C magnetic hyperthermia of melanoma mediated by iron(0)/iron oxide core/shell magnetic nanoparticles: a mouse study, *BMC Cancer* 10 (2010) 119.
- [118] M. Camerin, M. Magaraggia, M. Soncin, G. Jori, M. Moreno, I. Chambrier, M.J. Cook, D.A. Russell, The in vivo efficacy of phthalocyanine-nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma, *Eur J Cancer* 46 (2010) 1910-1918.

- [119] C.F. van Nostrum, Polymeric micelles to deliver photosensitizers for photodynamic therapy, *Adv Drug Deliv Rev* 56 (2004) 9-16.
- [120] C. Tu, L. Zhu, P. Li, Y. Chen, Y. Su, D. Yan, X. Zhu, G. Zhou, Supramolecular polymeric micelles by the host-guest interaction of star-like calix[4]arene and chlorin e6 for photodynamic therapy, *Chem Commun (Camb)* 47 (2011) 6063-6065.
- [121] H.C. Tsai, C.H. Tsai, S.Y. Lin, C.R. Jhang, Y.S. Chiang, G.H. Hsiue, Stimulated release of photosensitizers from graft and diblock micelles for photodynamic therapy, *Biomaterials* 33 (2012) 1827-1837.
- [122] S. Herlambang, M. Kumagai, T. Nomoto, S. Horie, S. Fukushima, M. Oba, K. Miyazaki, Y. Morimoto, N. Nishiyama, K. Kataoka, Disulfide crosslinked polyion complex micelles encapsulating dendrimer phthalocyanine directed to improved efficiency of photodynamic therapy, *J Control Release* 155 (2011) 449-457.
- [123] P. Huang, J. Lin, D. Yang, C. Zhang, Z. Li, D. Cui, Photosensitizer-loaded dendrimer-modified multi-walled carbon nanotubes for photodynamic therapy, *J Control Release* 152 Suppl 1 (2011) e33-34.
- [124] P. Kesharwani, V. Gajbhiye, R.K. Tekade, N.K. Jain, Evaluation of dendrimer safety and efficacy through cell line studies, *Curr Drug Targets* 12 (2011) 1478-1497.
- [125] P. Ceroni, A.Y. Lebedev, E. Marchi, M. Yuan, T.V. Esipova, G. Bergamini, D.F. Wilson, T.M. Busch, S.A. Vinogradov, Evaluation of phototoxicity of dendritic porphyrin-based phosphorescent oxygen probes: an in vitro study, *Photochem Photobiol Sci* 10 (2011) 1056-1065.
- [126] J.F. Jansen, E.M. de Brabander-van den Berg, E.W. Meijer, Encapsulation of guest molecules into a dendritic box, *Science* 266 (1994) 1226-1229.
- [127] J. Folkman, Tumor angiogenesis: therapeutic implications, *N Engl J Med* 285 (1971) 1182-1186.
- [128] D.M. McDonald, P.L. Choyke, Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic, *Nat Med* 9 (2003) 713-725.
- [129] J. Scoazec, L'angiogénèse tumorale, *Ann. Pathol.* 20 (2000) 25-37.
- [130] U. Chakravarthy, S.P. Harding, C.A. Rogers, S.M. Downes, A.J. Lotery, S. Wordsworth, B.C. Reeves, Ranibizumab versus bevacizumab to treat neovascular age-related macular degeneration: one-year findings from the IVAN randomized trial, *Ophthalmology* 119 (2012) 1399-1411.
- [131] A. Bikfalvi, Tumor angiogenesis, *Bull Cancer hors série* (2006) 154-164.
- [132] G. Bergers, L.E. Benjamin, Tumorigenesis and the angiogenic switch, *Nat Rev Cancer* 3 (2003) 401-410.
- [133] K. He, K. Jin, H. Wang, L. Teng, Anti-angiogenic therapy for colorectal cancer: on the way to getting better!, *Hepatogastroenterology* 59 (2012) 1113-1117.
- [134] D.J. Hicklin, L.M. Ellis, Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis, *J Clin Oncol* 23 (2005) 1011-1027.
- [135] J.M. Wu, C.A. Staton, Anti-angiogenic drug discovery: lessons from the past and thoughts for the future, *Expert Opin Drug Discov* 7 (2012) 723-743.
- [136] http://www.oncoprof.net/Generale2000/g09_Chimiotherapie/Complements/g09_comp58.inc.php.
- [137] B. Berse, L.F. Brown, L. Van de Water, H.F. Dvorak, D.R. Senger, Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors, *Mol Biol Cell* 3 (1992) 211-220.

- [138] A.W. Griffioen, G. Molema, Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation, *Pharmacol Rev* 52 (2000) 237-268.
- [139] D.R. Senger, S.J. Galli, A.M. Dvorak, C.A. Perruzzi, V.S. Harvey, H.F. Dvorak, Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid, *Science* 219 (1983) 983-985.
- [140] D. Maglione, V. Guerriero, G. Viglietto, P. Delli-Bovi, M.G. Persico, Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor, *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 9267-9271.
- [141] A. Sawano, T. Takahashi, S. Yamaguchi, M. Aonuma, M. Shibuya, Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor, *Cell Growth Differ* 7 (1996) 213-221.
- [142] M.C. Pirrung, K. Park, Discovery of selective metal-binding peptoids using 19F encoded combinatorial libraries, *Bioorg Med Chem Lett* 10 (2000) 2115-2118.
- [143] H.W. Christinger, G. Fuh, A.M. de Vos, C. Wiesmann, The crystal structure of placental growth factor in complex with domain 2 of vascular endothelial growth factor receptor-1, *J Biol Chem* 279 (2004) 10382-10388.
- [144] B. Olofsson, M. Jeltsch, U. Eriksson, K. Alitalo, Current biology of VEGF-B and VEGF-C, *Curr Opin Biotechnol* 10 (1999) 528-535.
- [145] T. Tammela, B. Enholm, K. Alitalo, K. Paavonen, The biology of vascular endothelial growth factors, *Cardiovasc Res* 65 (2005) 550-563.
- [146] M. Lohela, A. Saaristo, T. Veikkola, K. Alitalo, Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies, *Thromb Haemost* 90 (2003) 167-184.
- [147] Y. Yamazaki, T. Morita, Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors, *Mol Divers* 10 (2006) 515-527.
- [148] G.H. Fong, J. Rossant, M. Gertsenstein, M.L. Breitman, Role of the Flt-1 receptor tyrosine kinase in regulating the assembly of vascular endothelium, *Nature* 376 (1995) 66-70.
- [149] P.E. Neagoe, C. Lemieux, M.G. Sirois, Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor-1 and -2 heterodimer, *J Biol Chem* 280 (2005) 9904-9912.
- [150] M.L. Gagnon, D.R. Bielenberg, Z. Gechtman, H.Q. Miao, S. Takashima, S. Soker, M. Klagsbrun, Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97 (2000) 2573-2578.
- [151] M. Rossignol, M.L. Gagnon, M. Klagsbrun, Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: identification and distribution of splice variants and soluble isoforms, *Genomics* 70 (2000) 211-222.
- [152] Q. Tao, S.C. Spring, B.I. Terman, Characterization of a new alternatively spliced neuropilin-1 isoform, *Angiogenesis* 6 (2003) 39-45.
- [153] E. Geretti, A. Shimizu, M. Klagsbrun, Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis, *Angiogenesis* 11 (2008) 31-39.
- [154] L. Wang, H. Zeng, P. Wang, S. Soker, D. Mukhopadhyay, Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration, *J Biol Chem* 278 (2003) 48848-48860.
- [155] C.W. Vander Kooi, M.A. Jusino, B. Perman, D.B. Neau, H.D. Bellamy, D.J. Leahy, Structural basis for ligand and heparin binding to neuropilin B domains, *Proc Natl Acad Sci U S A* 104 (2007) 6152-6157.

- [156] H. Cai, R.R. Reed, Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1, *J Neurosci* 19 (1999) 6519-6527.
- [157] L. Wang, D. Mukhopadhyay, X. Xu, C terminus of RGS-GAIP-interacting protein conveys neuropilin-1-mediated signaling during angiogenesis, *Faseb J* 20 (2006) 1513-1515.
- [158] S. Soker, S. Takashima, H.Q. Miao, G. Neufeld, M. Klagsbrun, Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor, *Cell* 92 (1998) 735-745.
- [159] A. Jarvis, C.K. Allerston, H. Jia, B. Herzog, A. Garza-Garcia, N. Winfield, K. Ellard, R. Aqil, R. Lynch, C. Chapman, B. Hartzoulakis, J. Nally, M. Stewart, L. Cheng, M. Menon, M. Tickner, S. Djordjevic, P.C. Driscoll, I. Zachary, D.L. Selwood, Small molecule inhibitors of the neuropilin-1 vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) interaction, *J Med Chem* 53 (2010) 2215-2226.
- [160] Q. Pan, Y. Chanthery, W.C. Liang, S. Stawicki, J. Mak, N. Rathore, R.K. Tong, J. Kowalski, S.F. Yee, G. Pacheco, S. Ross, Z. Cheng, J. Le Couter, G. Plowman, F. Peale, A.W. Koch, Y. Wu, A. Bagri, M. Tessier-Lavigne, R.J. Watts, Blocking neuropilin-1 function has an additive effect with anti-VEGF to inhibit tumor growth, *Cancer Cell* 11 (2007) 53-67.
- [161] M. Murga, O. Fernandez-Capetillo, G. Tosato, Neuropilin-1 regulates attachment in human endothelial cells independently of vascular endothelial growth factor receptor-2, *Blood* 105 (2005) 1992-1999.
- [162] L.M. Ellis, The role of neuropilins in cancer, *Mol Cancer Ther* 5 (2006) 1099-1107.
- [163] H. Oh, H. Takagi, A. Otani, S. Koyama, S. Kemmochi, A. Uemura, Y. Honda, Selective induction of neuropilin-1 by vascular endothelial growth factor (VEGF): a mechanism contributing to VEGF-induced angiogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002) 383-388.
- [164] G. Serini, D. Valdembrì, S. Zanivan, G. Morterra, C. Burkhardt, F. Caccavari, L. Zammataro, L. Primo, L. Tamagnone, M. Logan, M. Tessier-Lavigne, M. Taniguchi, A.W. Puschel, F. Bussolino, Class 3 semaphorins control vascular morphogenesis by inhibiting integrin function, *Nature* 424 (2003) 391-397.
- [165] R.A. Weersink, J. Forbes, S. Bisland, J. Trachtenberg, M. Elhilali, P.H. Brun, B.C. Wilson, Assessment of cutaneous photosensitivity of WST09 (TOOKAD) in preclinical animal models and in patients, *Photochem Photobiol* 81 (2005) 106-113.
- [166] Q. Chen, Z. Huang, D. Luck, J. Beckers, P.H. Brun, B.C. Wilson, A. Scherz, Y. Salomon, F.W. Hetzel, Preclinical studies in normal canine prostate of a novel palladium-bacteriopheophorbide (WST09) photosensitizer for photodynamic therapy of prostate cancers, *Photochem Photobiol* 76 (2002) 438-445.
- [167] N.V. Koudinova, J.H. Pinthus, A. Brandis, O. Brenner, P. Bendel, J. Ramon, Z. Eshhar, A. Scherz, Y. Salomon, Photodynamic therapy with Pd-Bacteriopheophorbide (TOOKAD): successful in vivo treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts, *Int J Cancer* 104 (2003) 782-789.
- [168] J.H. Woodhams, A.J. MacRobert, M. Novelli, S.G. Bown, Photodynamic therapy with WST09 (Tookad): quantitative studies in normal colon and transplanted tumours, *Int J Cancer* 118 (2006) 477-482.
- [169] F. Borle, A. Radu, C. Fontollet, H. van den Bergh, P. Monnier, G. Wagnieres, Selectivity of the photosensitizer Tookad for photodynamic therapy evaluated in the Syrian golden hamster cheek pouch tumour model, *Br J Cancer* 89 (2003) 2320-2326.
- [170] A. Tremblay, S. Leroy, L. Freitag, M.C. Copin, P.H. Brun, C.H. Marquette, Endobronchial phototoxicity of WST 09 (Tookad), a new fast-acting photosensitizer

- for photodynamic therapy: preclinical study in the pig, *Photochem Photobiol* 78 (2003) 124-130.
- [171] R. Schneider, L. Tirand, C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, J. Gravier, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy, *Anticancer Agents Med Chem* 6 (2006) 469-488.
- [172] U. Drechsler, M. Pfaff, M. Hanack, Synthesis of Novel Functionalised Zinc Phthalocyanines Applicable in Photodynamic Therapy, *Eur J Org Chem* (1999) 3441-3453.
- [173] K.L. Molpus, M.R. Hamblin, I. Rizvi, T. Hasan, Intraperitoneal photoimmunotherapy of ovarian carcinoma xenografts in nude mice using charged photoimmunoconjugates, *Gynecol Oncol* 76 (2000) 397-404.
- [174] V. Chaleix, V. Sol, Y. Huang, M. Guilloton, R. Granet, J. Blais, P. Krausz, RGD-Porphyrin Conjugates : Synthesis and Potential, *Eur.J.Org.chem* (2003) 1486-1493.
- [175] C. Frochot, B. Di Stasio, R. Vanderesse, M.J. Belgy, M. Dodeller, F. Guillemin, M.L. Viriot, M. Barberi-Heyob, Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity, *Bioorg Chem* 35 (2007) 205-220.
- [176] V. Chaleix, V. Sol, M. Guilloton, R. Granet, P. Krausz, Efficient synthesis of RGD-containing cyclic peptide-porphyrin conjugates by ring-closing metathesis on solid support, *Tetrahedron Lett* 45 (2004) 5295-5299.
- [177] L. Tirand, C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, E. Trinquet, S. Pinel, M.L. Viriot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells, *J Control Release* 111 (2006) 153-164.
- [178] R. Binetruy-Tournaire, C. Demangel, B. Malavaud, R. Vassy, S. Rouyre, M. Kraemer, J. Plouet, C. Derbin, G. Perret, J.C. Mazie, Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis, *Embo J* 19 (2000) 1525-1533.
- [179] G.Y. Perret, A. Starzec, N. Hauet, J. Vergote, M. Le Pecheur, R. Vassy, G. Leger, K.A. Verbeke, G. Bormans, P. Nicolas, A.M. Verbruggen, J.L. Moretti, In vitro evaluation and biodistribution of a ^{99m}Tc-labeled anti-VEGF peptide targeting neuropilin-1, *Nucl Med Biol* 31 (2004) 575-581.
- [180] N. Thomas, L. Tirand, E. Chatelut, F. Plenat, C. Frochot, M. Dodeller, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice, *Photochem Photobiol Sci* 7 (2008) 433-441.
- [181] L. Tirand, N. Thomas, M. Dodeller, D. Dumas, C. Frochot, B. Maunit, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: an in vivo and in vitro study, *Drug Metab Dispos* 35 (2007) 806-813.
- [182] G.H. Bird, N. Madani, A.F. Perry, A.M. Princiotto, J.G. Supko, X. He, E. Gavathiotis, J.G. Sodroski, L.D. Walensky, Hydrocarbon double-stapling remedies the proteolytic instability of a lengthy peptide therapeutic, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 (2010) 14093-14098.
- [183] K. Pitter, F. Bernal, J. Labelle, L.D. Walensky, Dissection of the BCL-2 family signaling network with stabilized alpha-helices of BCL-2 domains, *Methods Enzymol* 446 (2008) 387-408.

- [184] S. Iguchi, K. Kawasaki, H. Okamoto, C. Umezawa, Y. Okada, Synthesis of some pseudo-peptide analogs of thiol proteinase inhibitors, *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 47 (1999) 423-427.
- [185] H. Benachour, A. Sève, T. Bastogne, C. Frochot, R. Vanderesse, J. Jasniewski, I. Miladi, C. Billotey, O. Tillement, F. Lux, M. Barberi-Heyob, Multifunctional peptide-conjugated hybrid silica nanoparticles for photodynamic therapy and MRI, *Theranostics* under press (2012).
- [186] B. Rosenberg, L. VanCamp, J.E. Trosko, V.H. Mansour, Platinum compounds: a new class of potent antitumour agents, *Nature* 222 (1969) 385-386.
- [187] U. Jungwirth, C.R. Kowol, B.K. Keppler, C.G. Hartinger, W. Berger, P. Heffeter, Anticancer activity of metal complexes: involvement of redox processes, *Antioxid Redox Signal* 15 (2011) 1085-1127.
- [188] B. Rosenberg, Platinum complexes for the treatment of cancer: Why the search goes on, in: B. Lippert (Ed.), *Chemistry and biochemistry of a leading anticancer drug*, Wiley, New York, 1999, pp. 1-27.
- [189] Y.P. Ho, S.C. Au-Yeung, K.K. To, Platinum-based anticancer agents: innovative design strategies and biological perspectives, *Med Res Rev* 23 (2003) 633-655.
- [190] L. Kersten, H. Braunlich, B.K. Keppler, C. Gliesing, M. Wendelin, J. Westphal, Comparative nephrotoxicity of some antitumour-active platinum and ruthenium complexes in rats, *J Appl Toxicol* 18 (1998) 93-101.
- [191] L. Xia, Z. Chen, S. Yin, Ototoxicity of cisplatin administered to guinea pigs via the round window membrane, *J Toxicol Sci* 37 823-830.
- [192] S. Amptoulach, N. Tsavaris, Neurotoxicity caused by the treatment with platinum analogues, *Chemother Res Pract* 2011 843019.
- [193] B. Kumar, A. Yadav, J.C. Lang, M.J. Cipolla, A.C. Schmitt, N. Arradaza, T.N. Teknos, P. Kumar, YM155 Reverses Cisplatin Resistance in Head and Neck Cancer by Decreasing Cytoplasmic Survivin Levels, *Mol Cancer Ther* 11 (2012) 1988-1998.
- [194] C.R. Chitambar, W.E. Antholine, Iron-targeting antitumor activity of gallium compounds and novel insights into Triapine(R)-metal complexes, *Antioxid Redox Signal* (2012).
- [195] M. Hanif, A.A. Nazarov, C.G. Hartinger, W. Kandioller, M.A. Jakupec, V.B. Arion, P.J. Dyson, B.K. Keppler, Osmium(II)--versus ruthenium(II)--arene carbohydrate-based anticancer compounds: similarities and differences, *Dalton Trans* 39 (2010) 7345-7352.
- [196] T. Yamaguchi, S. Watanabe, Y. Matsumura, Y. Tokuoka, A. Yokoyama, Oxovanadium complexes with quinoline and pyridinone ligands: syntheses of the complexes and effect of alkyl chains on their apoptosis-inducing activity in leukemia cells, *Bioorg Med Chem* 20 (2012) 3058-3064.
- [197] C.G. Hartinger, A.D. Phillips, A.A. Nazarov, Polynuclear ruthenium, osmium and gold complexes. The quest for innovative anticancer chemotherapeutics, *Curr Top Med Chem* 11 (2011) 2688-2702.
- [198] G. Sava, R. Gagliardi, A. Bergamo, E. Alessio, G. Mestroni, Treatment of metastases of solid mouse tumours by NAMI-A: comparison with cisplatin, cyclophosphamide and dacarbazine, *Anticancer Res* 19 (1999) 969-972.
- [199] <http://photochemistryportal.net/home/index.php/category/ruthenium-photochemistry>.
- [200] M.K. Nazeeruddin, R. Humphry-Baker, D. Officer, W. Campbell, A. Burrell, M. Grätzel, Application of metalloporphyrins in nanocrystalline dye-sensitized solar cells for conversion of sunlight into electricity, *Langmuir* 20 (2004) 6514-6517.
- [201] A. Monari, X. Assfeld, M. Beley, P.C. Gros, Theoretical study of new ruthenium-based dyes for dye-sensitized solar cells, *J Phys Chem A* 115 (2011) 3596-3603.

- [202] M. DeRosa, R. Crutchley, Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coord Chem Rev* 233-234 (2002) 351-371.
- [203] G. Lemerrier, A. Bonne, M. Four, L. Lawson-Daku, ³MLCT excited states in Ru(II) complexes: reactivity and related two-photon absorption applications in the near-infrared spectral range, *C. R. Chimie* 11 (2008) 709-715.
- [204] S.C. Boca, M. Four, A. Bonne, B. van der Sanden, S. Astilean, P.L. Baldeck, G. Lemerrier, An ethylene-glycol decorated ruthenium(ii) complex for two-photon photodynamic therapy, *Chem Commun (Camb)* (2009) 4590-4592.
- [205] M. Four, D. Riehl, O. Mongin, M. Blanchard-Desce, L.M. Lawson-Daku, J. Moreau, J. Chauvin, J.A. Delaire, G. Lemerrier, A novel ruthenium(II) complex for two-photon absorption-based optical power limiting in the near-IR range, *Phys Chem Chem Phys* 13 (2011) 17304-17312.
- [206] F. Schmitt, P. Govindaswamy, G. Suss-Fink, W.H. Ang, P.J. Dyson, L. Juillerat-Jeanneret, B. Therrien, Ruthenium porphyrin compounds for photodynamic therapy of cancer, *J Med Chem* 51 (2008) 1811-1816.
- [207] F. Schmitt, P. Govindaswamy, O. Zava, G. Suss-Fink, L. Juillerat-Jeanneret, B. Therrien, Combined arene ruthenium porphyrins as chemotherapeutics and photosensitizers for cancer therapy, *J Biol Inorg Chem* 14 (2009) 101-109.
- [208] F. Schmitt, M. Auzias, P. Stepnicka, Y. Sei, K. Yamaguchi, G. Suss-Fink, B. Therrien, L. Juillerat-Jeanneret, Sawhorse-type diruthenium tetracarbonyl complexes containing porphyrin-derived ligands as highly selective photosensitizers for female reproductive cancer cells, *J Biol Inorg Chem* 14 (2009) 693-701.
- [209] X. Zhou, B.W. Pogue, B. Chen, E. Demidenko, R. Joshi, J. Hoopes, T. Hasan, Pretreatment photosensitizer dosimetry reduces variation in tumor response, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 64 (2006) 1211-1220.
- [210] L. Tirand, T. Bastogne, D. Bechet, M. Linder, N. Thomas, C. Frochot, F. Guillemain, M. Barberi-Heyob, Response surface methodology: an extensive potential to optimize in vivo photodynamic therapy conditions, *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 75 (2009) 244-252.
- [211] T. Bastogne, A. Samson, P. Vallois, S. Wantz-Mezieres, S. Pinel, D. Bechet, M. Barberi-Heyob, Phenomenological modeling of tumor diameter growth based on a mixed effects model, *J Theor Biol* 262 (2010) 544-552.
- [212] K.T. Moesta, W.R. Greco, S.O. Nurse-Finlay, J.C. Parsons, T.S. Mang, Lack of reciprocity in drug and light dose dependence of photodynamic therapy of pancreatic adenocarcinoma in vitro, *Cancer Res* 55 (1995) 3078-3084.
- [213] W.H. Carter, Jr., G.L. Wampler, Review of the application of response surface methodology in the combination therapy of cancer, *Cancer Treat Rep* 70 (1986) 133-140.
- [214] M.S. Patterson, B.C. Wilson, R. Graff, In vivo tests of the concept of photodynamic threshold dose in normal rat liver photosensitized by aluminum chlorosulphonated phthalocyanine, *Photochem Photobiol* 51 (1990) 343-349.
- [215] T.J. Farrell, B.C. Wilson, M.S. Patterson, M.C. Olivo, Comparison of the in vivo photodynamic threshold dose for photofrin, mono- and tetrasulfonated aluminum phthalocyanine using a rat liver model, *Photochem Photobiol* 68 (1998) 394-399.
- [216] S.G. Bown, C.J. Tralau, P.D. Smith, D. Akdemir, T.J. Wieman, Photodynamic therapy with porphyrin and phthalocyanine sensitisation: quantitative studies in normal rat liver, *Br J Cancer* 54 (1986) 43-52.
- [217] T.M. Busch, E.P. Wileyto, M.J. Emanuele, F. Del Piero, L. Marconato, E. Glatstein, C.J. Koch, Photodynamic therapy creates fluence rate-dependent gradients in the intratumoral spatial distribution of oxygen, *Cancer Res* 62 (2002) 7273-7279.

- [218] M. Bennett, T. Huang, T. Matheson, A. Smith, (η^6 -Hexamethylbenzene)Ruthenium Complexes in: J. Fackler (Ed.), *Inorganic Syntheses* John Wiley, New York, 1982, pp. 74-77.
- [219] P.G. Seybold, M. Gouterman, J. Callis, Calorimetric, photometric and lifetime determinations of fluorescence yields of fluorescein dyes, *Photochem Photobiol* 9 (1969) 229-242.
- [220] R.W. Redmond, J.N. Gamlin, A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules, *Photochem Photobiol* 70 (1999) 391-475.
- [221] H. Sun, H. Li, P.J. Sadler, Transferrin as a metal ion mediator, *Chem Rev* 99 (1999) 2817-2842.
- [222] F. Kratz, M. Hartmann, B. Keppler, L. Messori, The binding properties of two antitumor ruthenium(III) complexes to apotransferrin, *J Biol Chem* 269 (1994) 2581-2588.
- [223] M.J. Clarke, F. Zhu, D.R. Frasca, Non-platinum chemotherapeutic metallopharmaceuticals, *Chem Rev* 99 (1999) 2511-2534.
- [224] L. Gao, J. Fei, J. Zhao, H. Li, Y. Cui, J. Li, Hypocrellin-Loaded Gold Nanocages with High Two-Photon Efficiency for Photothermal/Photodynamic Cancer Therapy in Vitro, *ACS Nano* (2012).
- [225] H.S. Qian, H.C. Guo, P.C. Ho, R. Mahendran, Y. Zhang, Mesoporous-silica-coated up-conversion fluorescent nanoparticles for photodynamic therapy, *Small* 5 (2009) 2285-2290.
- [226] P. Mowat, A. Mignot, W. Rima, F. Lux, O. Tillement, C. Roulin, M. Dutreix, D. Bechet, S. Huger, L. Humbert, M. Barberi-Heyob, M.T. Aloy, E. Armandy, C. Rodriguez-Lafrasse, G. Le Duc, S. Roux, P. Perriat, In vitro radiosensitizing effects of ultrasmall gadolinium based particles on tumour cells, *J Nanosci Nanotechnol* 11 (2011) 7833-7839.
- [227] C.G. Hartinger, M.A. Jakupec, S. Zorbas-Seifried, M. Groessler, A. Egger, W. Berger, H. Zorbas, P.J. Dyson, B.K. Keppler, KP1019, a new redox-active anticancer agent--preclinical development and results of a clinical phase I study in tumor patients, *Chem Biodivers* 5 (2008) 2140-2155.
- [228] C.G. Hartinger, S. Zorbas-Seifried, M.A. Jakupec, B. Kynast, H. Zorbas, B.K. Keppler, From bench to bedside--preclinical and early clinical development of the anticancer agent indazolium trans-[tetrachlorobis(1H-indazole)ruthenate(III)] (KP1019 or FFC14A), *J Inorg Biochem* 100 (2006) 891-904.
- [229] J.M. Rademaker-Lakhai, D. van den Bongard, D. Pluim, J.H. Beijnen, J.H. Schellens, A Phase I and pharmacological study with imidazolium-trans-DMSO-imidazole-tetrachlororuthenate, a novel ruthenium anticancer agent, *Clin Cancer Res* 10 (2004) 3717-3727.
- [230] P.J. Dyson, G. Sava, Metal-based antitumour drugs in the post genomic era, *Dalton Trans* (2006) 1929-1933.
- [231] A. Vacca, M. Bruno, A. Boccarelli, M. Coluccia, D. Ribatti, A. Bergamo, S. Garbisa, L. Sartor, G. Sava, Inhibition of endothelial cell functions and of angiogenesis by the metastasis inhibitor NAMI-A, *Br J Cancer* 86 (2002) 993-998.
- [232] G. Sava, K. Clerici, I. Capozzi, M. Cocchietto, R. Gagliardi, E. Alessio, G. Mestroni, A. Perbellini, Reduction of lung metastasis by ImH[trans-RuCl₄(DMSO)Im]: mechanism of the selective action investigated on mouse tumors, *Anticancer Drugs* 10 (1999) 129-138.
- [233] A. Bergamo, R. Gagliardi, V. Scarcia, A. Furlani, E. Alessio, G. Mestroni, G. Sava, In vitro cell cycle arrest, in vivo action on solid metastasizing tumors, and host toxicity

- of the antimetastatic drug NAMI-A and cisplatin, *J Pharmacol Exp Ther* 289 (1999) 559-564.
- [234] L. Li, W. Cao, W. Zheng, C. Fan, T. Chen, Ruthenium complexes containing 2,6-bis(benzimidazolyl)pyridine derivatives induce cancer cell apoptosis by triggering DNA damage-mediated p53 phosphorylation, *Dalton Trans* (2012).
- [235] A.I. Tomaz, T. Jakusch, T.S. Morais, F. Marques, R.F. de Almeida, F. Mendes, E.A. Enyedy, I. Santos, J.C. Pessoa, T. Kiss, M.H. Garcia, [Ru(II)(eta(5)-C(5)H(5))(bipy)(PPh(3))](+), a promising large spectrum antitumor agent: Cytotoxic activity and interaction with human serum albumin, *J Inorg Biochem* (2012).
- [236] M.A. Furrer, F. Schmitt, M. Wiederkehr, L. Juillerat-Jeanneret, B. Therrien, Cellular delivery of pyrenyl-arene ruthenium complexes by a water-soluble arene ruthenium metalla-cage, *Dalton Trans* 41 (2012) 7201-7211.
- [237] F. Wang, H. Chen, J.A. Parkinson, S. Murdoch Pdel, P.J. Sadler, Reactions of a ruthenium(II) arene antitumor complex with cysteine and methionine, *Inorg Chem* 41 (2002) 4509-4523.
- [238] S.M. Meier, M. Hanif, W. Kandioller, B.K. Keppler, C.G. Hartinger, Biomolecule binding vs. anticancer activity: reactions of Ru(arene)[(thio)pyr-(id)one] compounds with amino acids and proteins, *J Inorg Biochem* 108 (2012) 91-95.
- [239] H. Song, J.T. Kaiser, J.K. Barton, Crystal structure of Delta-[Ru(bpy)(2)dppz](2+) bound to mismatched DNA reveals side-by-side metalloinsertion and intercalation, *Nat Chem* 4 (2012) 615-620.
- [240] L.Y. Li, H.N. Jia, H.J. Yu, K.J. Du, Q.T. Lin, K.Q. Qiu, H. Chao, L.N. Ji, Synthesis, characterization, and DNA-binding studies of ruthenium complexes [Ru(tpy)(ptn)]²⁺ and Ru(dmtpy)(ptn)]²⁺, *J Inorg Biochem* 113 (2012) 31-39.
- [241] X.W. Liu, Y.D. Chen, L. Li, J.L. Lu, D.S. Zhang, DNA-binding and photocleavage studies of ruthenium(II) complexes containing asymmetric intercalative ligand, *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 86 (2012) 554-561.
- [242] A.M. Pizarro, P.J. Sadler, Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes, *Biochimie* 91 (2009) 1198-1211.
- [243] P. Heffeter, K. Bock, B. Atil, M.A. Reza Hoda, W. Korner, C. Bartel, U. Jungwirth, B.K. Keppler, M. Micksche, W. Berger, G. Koellensperger, Intracellular protein binding patterns of the anticancer ruthenium drugs KP1019 and KP1339, *J Biol Inorg Chem* 15 (2010) 737-748.
- [244] M.A. Jakupec, E. Reisner, A. Eichinger, M. Pongratz, V.B. Arion, M. Galanski, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, Redox-active antineoplastic ruthenium complexes with indazole: correlation of in vitro potency and reduction potential, *J Med Chem* 48 (2005) 2831-2837.
- [245] T. Chen, Y. Liu, W.J. Zheng, J. Liu, Y.S. Wong, Ruthenium polypyridyl complexes that induce mitochondria-mediated apoptosis in cancer cells, *Inorg Chem* 49 (2010) 6366-6368.
- [246] M. Groessl, Y.O. Tsybin, C.G. Hartinger, B.K. Keppler, P.J. Dyson, Ruthenium versus platinum: interactions of anticancer metallodrugs with duplex oligonucleotides characterised by electrospray ionisation mass spectrometry, *J Biol Inorg Chem* 15 (2010) 677-688.
- [247] A.A. Abdel-Shafi, D.R. Worrall, A.Y. Ershov, Photosensitized generation of singlet oxygen from ruthenium(II) and osmium(II) bipyridyl complexes, *Dalton Trans* (2004) 30-36.
- [248] M. Ascencio, J. Estevez, M. Delemer, M. Farine, P. Collinet, S. Mordon, Comparison of continuous and fractionated illumination during hexaminolaevulinate-photodynamic therapy, *Photodiagnosis Photodyn Ther* 5 (2008) 210-216.

Amélioration de l'efficacité en thérapie photodynamique par couplage du photosensibilisateur à des molécules actives

Pour améliorer la sélectivité cellulaire tumorale et/ou l'efficacité anti-tumorale de la thérapie photodynamique (PDT), des molécules actives (peptides, pseudo-peptides, agent alkylant) ont été conjuguées à la molécule photo-activable.

Dans une 1^{ère} partie, l'effet vasculaire de la PDT a été favorisé par le ciblage de la vascularisation tumorale de phénotype angiogénique. Un photosensibilisateur de type chlorine a été couplé à un peptide ligand de neuropiline-1 (NRP-1) et a montré son efficacité anti-tumorale *in vitro* et *in vivo* en PDT. Cependant, la partie peptidique s'est avérée instable *in vivo*. Des pseudo-peptides modifiés au niveau du site de clivage du peptide initial ont été synthétisés et testés *in vitro*, conjugués ou non à la chlorine. L'incorporation cellulaire de la chlorine a été améliorée après son couplage aux pseudo-peptides. Une technique d'ARN interférence, visant à éteindre l'expression de NRP-1 dans les cellules MDA-MB-231, surexprimant NRP-1, a mis en évidence l'incorporation cellulaire récepteur-dépendante des conjugués et leur sélectivité cellulaire. Les pseudo-peptides et conjugués se sont révélés affins pour NRP-1 et plus stables *in vivo*.

Le ruthénium (Ru) s'affiche comme une molécule d'intérêt thérapeutique en oncologie. Dans une 2^{ème} partie, nous avons appréhendé l'intérêt *in vivo* de coupler cet agent alkylant à des photosensibilisateurs de type porphyrine et chlorine. Les études d'efficacité *in vivo* sur un modèle de souris *nude* xénotransplantées en ectopique avec des cellules de carcinome oral humain KB, ont été menées par une méthodologie de plans d'expérience. Deux conjugués [Ru(η^6 -*p*-PrⁱC₆H₄Me)(5-(3-pyridyl)-10,15,20-triphenylporphyrin)Cl₂, ou Rut1, et Ru₄(η^6 -*p*-PrⁱC₆H₄Me)₄(5,10,15,20-tetra(3-pyridyl)porphyrin)Cl₈, ou Rut4] efficaces *in vitro* ont été comparés *in vivo*. Le composé Rut4 est apparu comme le plus efficace. Des études de biodistribution par spectrofluorimétrie fibrée et de pharmacocinétique classique ont montré un intervalle drogue-lumière optimal de 24h. Néanmoins, malgré l'optimisation des modalités thérapeutiques, le couplage du Ru avec une molécule photo-activable (porphyrine ou chlorine) n'a pas conduit à une efficacité anti-tumorale significative *in vivo*.

Mots clef : Thérapie photodynamique; ciblage ; neuropiline-1; ruthénium; planification d'expérience *in vivo*.

Photodynamic therapy efficiency improvement by coupling the photosensitizer with active molecules

To improve tumor cells selectivity and/or photodynamic therapy (PDT) anti-tumor efficiency, active molecules (peptides, pseudo-peptides, alkylating agents) have been conjugated to the photo-activable molecule.

In a first part, vascular effect of PDT has been promoted by targeting the tumor vasculature with angiogenic phenotype. A chlorine-type photosensitizer have been coupled to a neuropilin-1 (NRP-1)-targeting peptide and has shown its *in vitro* and *in vivo* anti-tumor efficiency for PDT. However, the peptidic sequence has been degraded *in vivo*. Clivage site-modified pseudo-peptides have been synthesized and tested *in vitro*, conjugated to TPC or not. Chlorine cellular uptake has been improved after coupling with pseudo-peptides. A technique of RNA interference-mediated silencing of NRP-1 in MDA-MB-231, over-expressing NRP-1, has highlighted the receptor-dependent uptake of the conjugates and their cellular selectivity. Pseudo-peptides and conjugates have shown their NRP-1 affinity and their *in vivo* stability.

Ruthenium (Ru) is considered as an interest therapeutic molecule in oncology. In a second part, we have studied the *in vivo* interest of coupling an alkylating agent with porphyrine and chlorine-type photosensitizers. The *in vivo* efficiency studies on nude mice xenografted ectopically with KB cells have been carried using experimental design approach. Two *in vitro* efficient conjugates [Ru(η^6 -*p*-PrⁱC₆H₄Me)(5-(3-pyridyl)-10,15,20-triphenylporphyrin)Cl₂, or Rut1, and Ru₄(η^6 -*p*-PrⁱC₆H₄Me)₄(5,10,15,20-tetra(3-pyridyl)porphyrin)Cl₈, or Rut4] have been compared *in vivo*. Rut4 conjugate has appeared to be more efficient than Rut1. Biodistribution studies using fiber spectrofluorimeter and classic pharmacokinetic studies have shown an optimal drug-light interval of 24h. However, after PDT parameters optimization, the Ru coupling with a photo-activable molecule (porphyrin or chlorine) hasn't shown any significant *in vivo* anti-tumor efficiency.

Keywords: Photodynamic therapy; vascular targeting; neuropilin-1; ruthenium; *in vivo* experimental planning.