



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>

UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ-NANCY I
1995

ÉCOLE DOCTORALE «BIOLOGIE ET SANTÉ»

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement
le 13 novembre 1995
pour obtenir le titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
HENRI POINCARÉ-NANCY I

PHARMACOLOGIE

par Nadia ZEGHARI

CARACTÉRISATION ET ÉTUDE DES CONSÉQUENCES
BIOLOGIQUES DU PHOTOBLANCHIMENT
DE L'HÉMATOPORPHYRINE DÉRIVÉE
UTILISÉE EN THÉRAPIE PHOTODYNAMIQUE

Membres du jury :

Juges : Pr F. GUILLEMIN
Pr C. VIGNERON
Pr L. BOLOTINA-BEZDETNYA
Dr D. BRAULT
Dr J.L. MERLIN

Rapporteurs : Pr H. VAN DEN BERGH
Dr J. BLAIS



FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES

UNIVERSITE Henri Poincaré - NANCY 1

Année Universitaire 1994/1995

Membres du personnel enseignant

DOYENC. VIGNERON

VICE DOYENG. CATAU

PROFESSEURS HONORAIRES

M. BERNANOSE André
Mlle BESSON Suzanne
Mlle GIRARD Thérèse
M. MEUNIER André

M. MIRJOLET Marcel
M. PIERFITTE Maurice
M. RICHARD Georges
M. SOLEIL Jean

MAITRE DE CONFERENCES HONORAIRE

Mme BALDO Suzanne

PROFESSEURS

M. ATKINSON Jeffrey
M. BAGREL Alain
Mlle BATT Anne Marie
M. BLOCK Jean Claude
M. BONALY Roger
Mme FINANCE Chantal
Mlle GALTEAU Marie Madeleine
M. HOFFMAN Maurice
M. JACQUE Michel
M. KERGOSIEN Yannick
M. LABRUDE Pierre
M. LALLOZ Lucien
M. LECTARD Pierre
M. LEMAY René
M. LOPPINET Vincent
M. MAINCENT Philippe
M. MARSURA Alain
M. MARTIN Jean Armand
M. MORTIER François
M. NICOLAS Alain
Mme SCHWARTZBROD Janine
M. SCHWARTZBROD Louis
M. SIEST Gérard
M. VIGNERON Claude

Pharmacodynamie
Biochimie fondamentale et clinique, biotechnologies
Toxicologie
Santé et Environnement
Biochimie microbienne
Microbiologie moléculaire
Biochimie
Pharmacie clinique
Pharmacodynamie
Mathématiques - Biophysique
Physiologie
Chimie Organique
Biologie végétale et Cryptogamie
Droit et économie pharmaceutique
Chimie thérapeutique
Pharmacie galénique
Chimie thérapeutique
Chimie minérale et Minéralogie
Pharmacognosie
Chimie analytique et Bromatologie
Bactériologie - Parasitologie
Virologie - Immunologie
Chimie biologique
Hématologie

PROFESSEURS ASSOCIES OU INVITES

M.	BAVEYE Philippe	Santé - Environnement
M.	BODMEIER Roland	Pharmacie Galénique
Mle	CHARGOIS Anne	Pharmacologie
M.	O'KANE Maurice	Biochimie
M.	SHUVAEV Vladimir	Biochimie
Mme	STOIANOV Marina	Biochimie Clinique
Mme	STREIBLOVA Eva	Biochimie microbienne
M.	VAN STRALEN Paul	Toxicologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme	ALBERT Monique	Bactériologie - Virologie
M.	BAUDOT Philippe	Toxicologie
Mme	BENOIT Emmanuelle	Chimie analytique
M.	BONNEAUX François	Chimie thérapeutique
Mme	CAPDEVILLE-ATKINSON Christine	Pharmacodynamie
M.	CATAU Gérard	Pharmacodynamie
M.	CHEVIN Jean Claude	Chimie minérale
M.	COLLIN Jean François	Pôle européen - Sécurité industrielle
Mme	COLLOMB Jocelyne	Parasitologie
M.	COULON Joël	Biochimie
M.	DECOLIN Dominique	Chimie analytique
Mle	FAIVRE Béatrice	GBM - Hématologie
M.	FERRARI Luc	Biochimie
Mme	FRIANT-MICHEL Pascale	Biophysique et Mathématiques
Mme	FUZELLIER Marie Claude	Pharmacognosie
M.	GHERMANI Nour-Eddine	Biophysique - Biomathématiques
Mle	HINZELIN Françoise	Biologie végétale et Pharmacognosie
Mme	HOFFMAN Marie Antoinette	Pharmacie clinique
M.	HUMBERT Thierry	Interactions moléculaires
Mle	IMBS Marie Andrée	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	KEDZIEREWICZ Francine	Pharmacie galénique
Mle	LARTAUD Isabelle ép. IDJOUADIENE	Pharmacologie
Mme	LEININGER MULLER Brigitte	Biochimie
M.	LEROY Pierre	Chimie analytique
Mme	LETOT Michèle	Bactériologie - Virologie et Parasitologie
Mme	LIVERTOUX Marie Hélène	Toxicologie
Mme	MARCHAND-ARVIER Monique	Immunologie - Hématologie
M.	MENU Patrick	Physiologie
M.	MIGNOT Bernard	Physique
M.	MONAL Jean Louis	Chimie thérapeutique
M.	NOTTER Dominique	Biologie cellulaire
Mme	PAULUS Francine	Informatique
Mme	PERDIAKIS Christine	Chimie organique
Mme	PICHON Virginie	Biophysique et Mathématiques
Mme	POCHON Marie France	Chimie analytique
Mme	ROVEL Anne	Immunologie - Hématologie
M.	VISVIKIS Athanase	Toxicologie
Mme	WELLMAN-ROUSSEAU Maria Monika	Biochimie

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE OU INVITE

M.	PURI Rajesh	Biologie cellulaire
----	-------------	---------------------

PROFESSEUR AGREGÉ

M. COCHAUD Christophe

Anglais

ASSISTANTS

Mme BERTHE Marie-Catherine

M. DANGIEN Bernard

Mme MOREAU Blandine

Mme MOUREY Michèle

Mme PAVIS Annie

M. TROCKLE Gabriel

Mme ZINUTTI Colette

Biochimie

Botanique

Pharmacognosie

Cryptogamie

Parasitologie

Pharmacodynamie

Pharmacie galénique

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

M. DAHAOUI Slimane

Mlle GAVRILOFF Catherine

Mme MENDES-PELLERIN Christina

Mlle UBRICH Nathalie

M. VIARD Benoît

Biophysique - Mathématiques

Chimie Analytique

Biologie Cellulaire - Hématologie

Biophysique - Mathématiques

Biochimie

MONITEURS D'INITIATION A L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR

Mlle EVRARD Anne

Mlle FENAUX Marie Laure

M. GASPARD Philippe

Mlle MAGDALINIUK Sandrine

Mlle MAURICE Marie Hélène

Mlle PARMENTIER Christine

M. SOETENS Jean Christophe

Biochimie clinique

Cytologie - Hémostase

Initiation à la connaissance du médicament

Biologie cellulaire

Toxicologie

Chimie Analytique

Biomathématiques

DOCTEURS HONORIS CAUSA

M. ANDERSON Norman G.

M. BETTOLO Marini

M. BLOCH Konrad E.

M. BOVET Daniel

M. DUTTON Geoffrey J.

M. GHUYSEN Jean Marie

M. HEIDELBERGER

M. KOFOED Helmer

M. PARRES FARRAS Ramon

Illinois - USA

Rome - ITALIE

Massachusetts - USA

Rome - ITALIE

Dundee - ECOSSE

Liège - BELGIQUE

New Jersey - USA

Copenhague - DANEMARK

Barcelone - ESPAGNE

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

M.	AZRIA	Pharmacologie
M.	BARADEL	Conseils vétérinaires
Mme	BLOCH	Gynécologie
M.	CAMUZEAX	Maintien à domicile
M.	CHARPIGNON	Gestion, commercialisation
M.	DANOUX	Comptabilité
M.	DEMANGE	Pharmacie clinique
M.	DOUCHE	Services de la Distribution pharmaceutique
Mme	EVARD	Services de la Distribution pharmaceutique
M.	FRANCAIS	Services de la Distribution pharmaceutique
M.	GABLE	Maintien à domicile
M.	GIESENFELD	Pharmacie clinique
Mme	GILGENKRANTZ	Génétique
M.	HACHET	Services de la Distribution pharmaceutique
M.	JACQUOT	Assurance - qualité
M.	JOUAULT	Services de la Distribution pharmaceutique
Mme	LABAIE	Audiologie
M.	LAMOTTE	Physique (acoustique)
M.	LE FLOCH	Gestion, Droit du travail, Droit commercial
M.	LEVIN	Services de la Distribution pharmaceutique
M.	LOUIS	Séméiologie
Mle	MANGIN	Pharmacie clinique
M.	MAUARY	Séméiologie
M.	MAY	Maladies infectieuses
M.	NICOLAY	Anatomie
M.	PARDON	Services de la Distribution pharmaceutique
Mle	PICAUT	Pharmacie clinique
M.	RENAUX	Secourisme
M.	RETOURNARD	Electronique
M.	ROLLET	Secourisme
M.	ROUYER	Législation, Podologie, Orthopédie
M.	SIMON	Audiologie
M.	TRECHOT	Pharmacovigilance - Effets indésirables des médicaments
M.	TURKAWKA	Relations humaines, techniques de la communication
Mle	WOLF	Services de la Distribution pharmaceutique

Avant propos

Titres et adresses des membres du jury

Professeur Lina Bolotine-Bezdetnaya

Professeur invité de la Faculté de Médecine, Université Henry Poincaré Nancy I
Professeur assistant, Dept Medical and Biological Physics, Russian State Medical University, Moscow, Russia.

Professeur François Guillemain

Professeur de la Faculté de Médecine, Université Henry Poincaré Nancy I
Chirurgien des Hôpitaux
Sous-Directeur chargé de la Recherche et l'Enseignement au Centre Alexis Vautrin
Avenue de Bourgogne Brabois, 54511 Vandoeuvre-Les-Nancy cedex.

Professeur Hubert VAN DEN BERGH

Professeur à l'Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne
IGE, Département du génie rural
Ecublens, CH-1015-Lausanne, Suisse

Professeur Claude VIGNERON

Doyen de la faculté de Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Nancy, Université Henry Poincaré Nancy I
Responsable du Laboratoire d'Hématologie et Physiologie (EA 1125 MESR), Université de Nancy I.

Docteur Jocelyne Blais

Directeur de recherche
LPCB, Section physique et chimie,
Institut Curie,
11, rue P. et M. Curie 75231 Paris cedex 05.

Docteur Daniel BRAULT

Directeur de Recherche INSERM
Muséum National d'Histoire Naturelle
Laboratoire de Biophysique
Inserm Unité 201-CNRS Unité Associée 481
43, rue Cuvier Paris cedex 05

Docteur Jean-Louis Merlin

Docteur en pharmacie, Docteur en Génie Biologique
Responsable du Laboratoire de Recherche en Oncologie, Centre Alexis Vautrin
Avenue de Bourgogne Brabois, 54511 Vandoeuvre-Les-Nancy cedex.

Je tiens à remercier particulièrement *Mr le Professeur François GUILLEMIN* qui a guidé ce travail et qui m'a fait l'honneur de m'accueillir au sein de l'Unité de Recherche en Thérapie Photodynamique. Je ne saurais lui dire dans ces quelques lignes tout ce que ce travail lui doit, qu'il trouve ici l'expression de mon profond respect.

Je tiens à témoigner ma gratitude à *Mr le Professeur Claude VIGNERON* pour m'avoir accordé sa confiance. Je le remercie de m'avoir permis de réaliser ce travail et d'avoir accepté de le juger.

Je remercie *Mme le Professeur Lina BEZDET NAYA* pour son amicale et chaleureuse attention, pour sa disponibilité et ses conseils.

J'exprime ma gratitude à *Mr le Docteur Jean-Louis MERLIN* qui dans un climat d'amitié bienveillante a suivi avec beaucoup d'attention l'élaboration de cette étude et m'a prodigué de judicieux conseils.

J'adresse mon profond respect à *Mr le Professeur Hubert VAN DEN BERGH* qui m'a fait l'honneur de participer au jury de cette thèse et qui a accepté d'en être le rapporteur.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance à *Mme le Docteur Jocelyne BLAIS* pour l'honneur qu'elle a bien voulu me faire en acceptant d'être le rapporteur de ce travail.

A *Mr le Docteur Daniel BRAULT*, qui m'honore de sa participation au jury de cette thèse, j'adresse mes marques de respect et tous mes remerciements.

Pour son accueil bienveillant et pour sa grande disponibilité, je prie *Mme le Docteur Geneviève BOURG-HECKLY* de trouver ici l'expression de mes sincères remerciements.

Mes remerciements s'adressent également

A toute l'équipe du Laboratoire de Recherche en Oncologie, votre disponibilité et votre gentillesse m'auront soutenues durant toutes ces années. Merci pour le climat chaleureux et amical que j'ai trouvé parmi vous, soyez assurés de ma sincère amitié.

Enfin, je voudrais remercier Mr Martel qui s'est toujours montré disponible pour réaliser tous les travaux de reprographie de cette thèse.

A mes parents

En gage de mon éternelle reconnaissance et de tout mon amour.

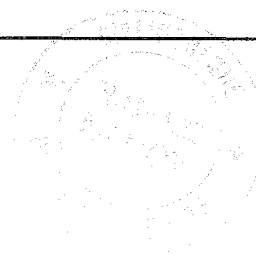
A Hassan

A Nezha, Zakaria et R'Kia

A toute ma famille et tous ceux qui me sont chers

Sommaire et table des matières

SOMMAIRE



Introduction générale

PREMIÈRE PARTIE : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I

La thérapie photodynamique, applications cliniques et expérimentales

Chapitre II

Les concepts photochimiques et photophysiques

Chapitre III

La lumière

Chapitre IV

Les porphyrines et leurs dérivés

Chapitre V

Transport, localisation et sélectivité des porphyrines

Chapitre VI

Les autres photosensibilisateurs

Chapitre VII

Effet de la PDT sur les cellules et les tissus

Chapitre VIII

Photoblanchiment ou photodégradation des porphyrines

SECONDE PARTIE : EXPÉRIMENTATION

I -Essais *in vitro*

Chapitre IX

**Evaluation de l'effet de l'association séquentielle de deux photoirradiations.
Conséquences du photoblanchiment et de la formation des photoproduits sur
l'efficacité de la PDT**

Chapitre X

**Étude de l'influence du microenvironnement sur le photoblanchiment de l'HpD
Analyse comparative des cinétiques de photodégradation évaluées par méthodes
spectroscopiques et par un test biologique de la photoinactivation cellulaire.**

II - Expérimentation animale

Chapitre XI

**Détermination des constantes de photodégradation de l'HpD sur tumeurs HT29
photoirradiées. Analyse comparative des taux de photodégradation obtenus avec
deux longueurs d'onde de photoirradiations différentes (413 et 630 nm).**

Chapitre XII

**Evaluation de l'effet de l'association séquentielle de deux photoirradiations sur
tumeurs HT29 greffées**

TROISIÈME PARTIE : CONCLUSION

Conclusion générale et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

TABLE DES MATIÈRES

Introduction générale	1
-----------------------------	---

PREMIÈRE PARTIE : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I	2
------------------	---

La thérapie photodynamique, applications cliniques et expérimentales

1- Historique de la thérapie photodynamique	2
2- Les applications cliniques.	3
2-1- Les tumeurs cutanées et sous-cutanées	4
2-2- Les tumeurs de la sphère ORL (tête et cou)	4
2-3- Les tumeurs du système nerveux central	4
2-4- Les tumeurs oculaires	4
2-5- Les tumeurs bronchiques	4
2-6- Les tumeurs des tractus œsophagien et gastrointestinal	5
2-6-1- Les tumeurs œsophagiennes	5
2-6-2- Les tumeurs gastriques	5
2-7- Les tumeurs du tractus génito-urinaire	5
2-8- Les tumeurs gynécologiques	5
2-8-1- Les tumeurs du vagin	5
2-8-2- Les tumeurs de la vulve	5
2-8-3- Les tumeurs du col de l'utérus	5
2-8-4- Les tumeurs de l'ovaire	5
3- La photodétection en PDT	6

Chapitre II	7
-------------------	---

Les concepts photochimiques et photophysiques

1- Absorption électronique	7
2- Description des états excités électroniques	7
3- Processus de désactivation de l'état singulet	8
3-1- Processus non radiatifs	8
3-2 - Processus radiatif: émission de fluorescence	8
4- Réactions photochimiques impliquées en PDT	9
4-1- Réactions de type I	9

4-2- Réactions de type II	9
1-5-3- Réactions de type III	11
Chapitre III	12
La lumière	
1- Les sources de lumière utilisées.....	12
1-1- Les lampes	12
1-2- Les lasers.....	12
1-3 Les diodes laser	13
2- Distribution de la lumière dans les tissus.....	13
2-1- Les tumeurs superficielles	13
2-2- Les tumeurs intraluminales ou intracavitaires	13
2-3- Mode de distribution de la lumière	14
3- Dosimétrie de lumière.....	14
Chapitre IV	16
Les porphyrines et leurs dérivés	
1- Introduction	16
2- Structure chimique des porphyrines	16
3- Synthèse chimique des porphyrines.....	19
3-1- L'hématoporphyrine	19
3-2- L'hématoporphyrine dérivée (HpD)	20
4- Propriétés spectroscopiques des porphyrines	22
4-1- Spectre d'absorption	22
4-2- Spectres de fluorescence	23
4-2-1 Spectre d'émission	23
4-2-2 Spectre d'excitation	24
4-3- Effets physiques du milieu sur l'absorption d'une molécule	24
4-3-1- Effet du solvant	25
4-3-2- Effet du pH	25

Chapitre V	26
Transport, localisation et sélectivité des porphyrines	
1- Transport et localisation des porphyrines	26
2- Sélectivité tumorale des photosensibilisateurs	26
2-1- Influence des protéines du sérum sur la sélectivité tumorale	27
2-1-1- Composés Hydrophobes	27
2-1-2- Composés Hydrophiles	27
2-2- Influence des facteurs vasculaires au niveau des tumeurs	27
2-3- Influence du pH sur la sélectivité tumorale des porphyrines	28
2-4- Influence de la composition du stroma et de la matrice tissulaire des tumeurs	28
2-5- Les différentes méthodes proposées pour améliorer la sélectivité tumorale	29
3- Biodistribution des porphyrines dans les tissus et les cellules	29
3-1- Distribution dans les tissus et les organes	30
3-2- Distribution subcellulaire des porphyrines	30
3-2-1- Influence de la nature chimique des chaînes secondaires et de la charge des porphyrines	30
3-2-2- Influence du degré d'agrégation des porphyrines	31
3-3- La distribution subcellulaire de l'HpD	31
Chapitre VI	33
Les autres photosensibilisateurs	
1- Introduction	33
2- Les phthalocyanines	33
3- La méso tétra hydroxyphenyl chlorine (mTHPC)	34
4- La bactériochlorine a (BCA)	35
5- L'acide amino-lévulinique α (ALA)	35

Chapitre VII.....	37
Effet de la PDT sur les cellules et les tissu	
1-Introduction.....	37
2-Sites de photosensibilisation et de dommages cellulaires	37
2-1- Les photosensibilisateurs lipophiles et anioniques	37
2-2- Les photosensibilisateurs hydrophiles	38
2-3- Les photosensibilisateurs cationiques	38
2-4- Les photosensibilisateurs lipophiles.....	38
2-5- Les dérivés des porphyrines	38
2-5-1- L'hématoporphyrine dérivée.....	38
2-5-2- La fraction oligomérique de l'HpD.....	39
3- Effets vasculaires	40
4- Réponse tumorale	42
5-Apoptose et thérapie photodynamique.....	43
6- Les effets secondaires de la PDT	43
6-1- Effet sur la peau	43
6-2- Effet sur certains tissus	44
6-3- Effets mutagènes et carcinogènes	45
Chapitre VIII.....	46
Photoblanchiment ou photodégradation des porphyrines	
1-Introduction.....	46
2- Processus photochimiques de dégradation	46
3- Processus chimique de dégradation dans le milieu biologique.....	47
4-Influence du microenvironnement sur la cinétique de photoblanchiment	47
4-1-Photodégradation des porphyrines en solution	48
4-1-1 Influence du degré d'agrégation des porphyrines	48
4-1-2- Influence des solvants organiques.....	50
4-1-3-Influence de l'oxygène.....	51

4-1-4-Influence du pH et de la force ionique	51
4-1-5- Influence des substrats photo-oxydables.....	52
5-Méthodologies d'étude du photoblanchiment des porphyrines en milieu intracellulaire.....	53
5-1-Méthodes spectroscopiques.....	53
5-1-1 Spectrométrie d'absorption	53
5-1-2-Spectrométrie de fluorescence	54
5-1-1-2-l'émission de fluorescence	54
5-1-1-1 l'excitation de fluorescence.....	55
5-2-Altération du rendement de photoinactivation des cellules	55
5-3- Relation entre la peroxydation lipidique et la photodégradation des porphyrines cellulaires	56
6-Etude du photoblanchiment <i>in vivo</i>	57
6-1-Dosimétrie et photoblanchiment	57
6-2-Concept du photoblanchiment et son application dans les études <i>in vivo</i>	58
7-La phototransformation des porphyrines	58
7-1-Identification physico-chimique des produits de la photo-transformation	58
7-2-Intérêt biologique des produits de la phototransformation	59

SECONDE PARTIE : EXPÉRIMENTATION

Objectifs de l'étude	62
-----------------------------------	-----------

I -Essais *in vitro*

Chapitre IX	64
--------------------------	-----------

Evaluation de l'effet de l'association séquentielle de deux photoirradiations. Conséquences du photoblanchiment et de la formation des photoproduits sur l'efficacité de la PDT.

1-objectif de l'étude	65
2 - Matériel et méthodes.....	65
2-1- Hématoporphyrine dérivée (HpD)	65
2-2- Lignée cellulaire.....	65
2-3- Les sources de lumière	65
2-4 - Essais de cytotoxicité au MTT.....	66
2-5- Cytométrie en flux	70
2-6-Mesures spectrométriques.....	72
2-6-1- Photoirradiation des solutions.....	72

2-6-2-Spectrofluorimétrie	72
2-6-3-Spectrophotométrie	72
3-Résultats et discussion	74
3-1- Essais de cytotoxicité	74
3-1-1- Essais dose-réponse en lumière bleue	74
3-1-2- Photoirradiations séquentielles (415 et 630 nm)	75
3-1-2-1-Photoirradiations séquentielles comportant des fluences en lumière bleue ne provoquant aucune cytotoxicité	76
3-1-2-1- Photoirradiations séquentielles comportant des fluences en lumière bleue générant un effet cytotoxique	83
3-2- Etude par CMF de l'évolution de la fluorescence de l'HpD intracellulaire après photoirradiation,	83
3-3-Analyses spectrométriques	87
3-3-1-Mesures spectrofluorimétriques	87
3-3-1-1-Diminution de l'intensité de fluorescence totale de l'HpD en solutions photoirradiées.....	88
3-3-1-1-Détermination et caractérisation des photoproduits de l'HpD par	
spectrofluorimétrie différentielle.	91
3-3-2-Mesures spectrophotométriques.....	94
3-3-2-1- Disparition de la bande de Soret.....	94
3-3-2-2- Formation d'une bande d'absorption à 642 nm.....	95
4-Conclusion et perspectives.....	98
Chapitre X	99

Étude de l'influence du microenvironnement sur le photoblanchiment de l'HpD
Analyse comparative des cinétiques de photodégradation évaluées par méthodes spectroscopiques
et par un test biologique de la photoinactivation cellulaire.

1-Introduction.....	99
2-Matériel et méthodes.....	100
2-1- L'hématoporphyrine dérivée	100
2-2- Lignée et culture cellulaires	100
2-3- Les photoirradiations	100
2-3-1- La source de lumière	100
2-3-2- photoirradiations des solutions d'HpD.....	101
2-3-3 photoirradiation des cellules.....	101

2-4- Essai de cytotoxicité.....	101
2-5-Spectrométrie	103
2-5-1-Spectrofluorimétrie	103
2-5-2-Spectrophotométrie	103
2-6-Microscopie de fluorescence et analyse d'images.....	103
2-6-1-Préparation des cellules	103
2-6-2- Microscopie de fluorescence assistée par ordinateur	103
3-Résultats et discussion	104
3-1-Effets de l'interaction de l'HpD avec les protéines du sérum.....	104
3-1-1- Effet sur l'incorporation et la rétention de l'HpD par les cellules	104
3-1-2-Influence sur l'effet cytotoxique	106
3-1-3-Influence sur les propriétés spectroscopiques de l'HpD en solution.....	107
3-1-3-1-Modification du spectre d'absorption	107
3-1-3-2-Modification du spectre d'émission de fluorescence	108
3-1-3-3-Modification du spectre d'excitation de fluorescence	109
3-2-Analyse comparative des cinétiques de photoinactivation de l'HpD dans différents microenvironnements	111
3-2-1-Etude spectrométrique de la photodégradation de l'HpD en solution.....	111
3-2-1-1-Décroissance de l'absorption au niveau de la bande de solet.....	111
3-2-1-2-Décroissance de fluorescence	113
3-3-Evaluation de la photodégradation de l'HpD par essais de cytotoxicité.....	116
3-4-Visualisation de la photodégradation de l'HpD intracellulaire par microscopie de fluorescence et analyse d'images.....	120
3-4-1-Visualisation de la distribution intracellulaire de l'HpD	120
3-4-2-Visualisation de phénomène d'extinction de fluorescence.....	123
4-Conclusion et perspectives.....	128

II - Expérimentation animale

Chapitre XI	130
Détermination des constantes de photodégradation de l'HpD sur tumeurs HT29 photoirradiées. Analyse comparative des taux de photodégradation obtenus avec deux longueurs d'onde de photoirradiations différentes (413 et 630 nm).	
1-Introduction.....	130
2-Matériel et méthodes.....	131
2-1- Hématoporphyrine dérivée (HpD)	131
2-2- Modèle tumoral greffé.	131
2-3- Photoirradiation des tumeurs	131
2-4- Mesure de la fluorescence tumorale par spectrométrie frontale.	132
2-5- Détermination des quantités d'HpD intratumorales	132
2-5-1- Méthode chimique d'extraction	132
2-5-2- Mesure de la fluorescence des extraits tumoraux.....	133
2-5-3- Méthode de quantification de l'HpD intratumorale.....	133
2-5-3-1- Correction de l'autofluorescence des tissus.	133
2-5-3-2- Exemple de quantification de l'HpD sur un échantillon tumoral.	133
2-5-3-3.-Normalisation des résultats par rapport aux protéines tissulaires.....	135
3-Résultats	136
3-1- Evaluation de la photodégradation de l'HpD intratumorale par méthode spectrométrique.	136
3-1-1- Spectres d'émission de fluorescence sur tumeurs HT29	136
3-1-2- Étude de la photodégradation de l'HpD sur tumeurs HT29 greffées.....	137
3-2- Evaluation de la photodégradation de l'HpD intratumorale par méthode d'extraction chimique.	139
3-2-1- Validation de la méthode d'extraction	139
3-2-2- Détermination de la constante de photoblanchiment après exposition des tumeurs à la lumière bleue.	139
3-2-3 Détermination de la constante de photoblanchiment après exposition des tumeurs à la lumière rouge.....	142
3-2-4 Comparaison des constantes de photoblanchiment déterminées par spectrométrie et par ...	
4-Discussion.....	144
5-Conclusion et perspectives.....	148
Chapitre XII	149

Evaluation de l'effet de l'association séquentielle de deux photoirradiations sur tumeurs HT29 greffées

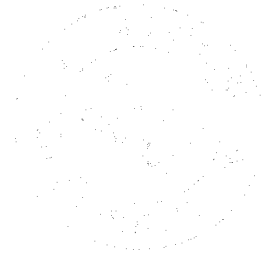
1-Introduction.....	149
2-Matériel et méthodes.....	150
2-1-Modèle animal.....	150
2-2-Photoirradiations des tumeurs	150
2-3-Mesure de la température intratumorale.....	151
2-4-Formule de calcul des doses de lumière équivalentes.	151
2-5- Mesure de la fluorescence tumorale par spectrométrie frontale.....	152
2-6- Détermination des quantités d'HpD intratumorale	152
2-7-Dosage indirect de la production des radicaux libres dans la tumeur après photoirradiation	153
2-7-1-Principe de dosage du MDA	153
2-7-2-Protocole de dosage du MDA dans les tumeurs photoirradiées.....	153
2-8-Évaluation de l'évolution du volume tumoral	154
2-9- Analyse statistique	154
3-Résultats	
3-1-Mesure de la température tumorale pendant le traitement photodynamique	155
3-2-Calcul des doses équivalentes de lumière.....	155
3-3-Évaluation par spectrométrie frontale du taux de photoblanchiment sur tumeurs photoirradiées	156
3-4- Évaluation du taux de photoblanchiment par extraction chimique de l'HpD intratumorale	158
3-5-Évaluation de la peroxydation lipidique au niveau des tumeurs	160
3-6- Evolution du volume des tumeurs après traitement.....	160
4-Discussion.....	162
5-Conclusion et perspectives.....	167

TROISIÈME PARTIE : CONCLUSION

Conclusion générale et perspectives	169
Références bibliographiques	172
Annexes	191

Introduction générale

INTRODUCTION GÉNÉRALE



Au Ve siècle avant J.C., Hérodote préconisait de longues expositions à la lumière solaire pour améliorer la forme physique ainsi que certaines fonctions neuronales. Le principe de la photothérapie repose sur l'absorption effective de la lumière par des molécules endogènes.

La photochimiothérapie ou thérapie photodynamique (PDT) consiste à administrer au patient un produit exogène capable de se fixer dans les zones pathologiques et d'absorber la lumière (photosensibilisateur) pour générer en présence d'oxygène des espèces moléculaires cytotoxiques responsables de l'effet thérapeutique.

Le concept de la PDT est vieux de 30 siècles, les indiens connaissaient empiriquement ce procédé pour guérir le *vitiligo* (Spikes 1987). Actuellement l'application de la photochimiothérapie la plus répandue est la PUVA thérapie pour traiter le psoriasis.

Introduction bibliographique

CHAPITRE I

LA THÉRAPIE PHOTODYNAMIQUE, APPLICATIONS CLINIQUES ET EXPÉRIMENTALES

1- Historique de la thérapie photodynamique

Le principe de photosensibilisation par la lumière via une substance chimique a été rapporté pour la première fois par Raab (1900) qui a observé un effet phototoxique sur des paramécies en présence d'acridine orange.

Le concept de la PDT, consistant à irradier des tumeurs par la lumière visible après administration d'une substance photosensibilisatrice a été appliqué pour la première fois par Tappeiner et Jesionek (1903) pour tenter de soigner des cancers cutanés chez plusieurs patients par une application topique d'éosine suivie d'une exposition à la lumière solaire.

En 1924, Policard a observé une fluorescence rouge attribuée à l'accumulation de porphyrines endogènes produites par une forme d'infection bactérienne hémolytique au niveau de tumeurs.

En 1942, Auler et Banzer ont rapporté une rétention de l'Hématoporphyrine (Hp) dans les sites néoplasiques, ce qui a été confirmé par Fige (1948) par analyse de fluorescence.

En 1960, Lipson et Baldes ont préparé une forme dérivée de l'Hp qui est un mélange complexe de diverses porphyrines : l'hématoporphyrine dérivée (HpD). La localisation tumorale de l'HpD au niveau des lésions néoplasiques épithéliales a été démontrée par fluorescence (Lipson 1961).

Le premier objectif de Lipson était la détection tumorale par fluorescence, il a ensuite réalisé l'intérêt de cette rétention sélective de l'HpD et la possibilité d'exploiter ses propriétés photodynamiques à des fins thérapeutiques. Le premier essai (Lipson, 1966) était un cas de cancer du sein ulcéré récidivé qu'il a traité par de multiples injections d'HpD et l'exposition locale à une lumière filtrée à partir d'une lampe à Xénon. La régression de la lésion après plusieurs semaines fût considérée comme satisfaisante. Jusqu'au milieu des années 70, aucun autre essai n'a été rapporté dans la littérature.

Les années 70 ont connu un regain d'intérêt pour cette forme de thérapie en raison de deux facteurs essentiels :

- le développement technologique des lasers et des fibres optiques,
- l'utilisation de l'HpD en tant qu'agent photosensibilisateur ayant une affinité pour les tissus cancéreux.

Les premiers essais réalisés *in vivo* avec l'HpD ont été rapportés par Dougherty (1975) sur tumeurs implantées en sous-cutanée chez des souris et des rats. L'injection de l'HpD par voie intrapéritonéale et l'exposition directe de la tumeur à la lumière rouge a conduit à une réduction du volume tumoral avec peu de dégâts au niveau des tissus environnants.

Après une nouvelle utilisation clinique isolée rapporté chez l'homme pour un cancer de la vessie (Kelly et Snell 1976), Dougherty et son équipe publièrent leur première série clinique (Dougherty, 1977 ; Dougherty, 1978), depuis lors plus de 10 000 cas ont été traités.

2 - Les applications cliniques.

La thérapie photodynamique (PDT) s'applique au traitement des lésions néoplasiques localisées : tumeurs superficielles peu étendues ou de petite taille (peau, voies aérodigestives supérieures, vessie, tumeurs du cerveau et de l'œil etc).

Initialement, la thérapie photodynamique fût appliquée à des grosses tumeurs pour lesquelles les autres traitements avaient échoué. Si son efficacité a été observée, aucun essai comparatif avec les méthodes conventionnelles n'a démontré sa supériorité.

L'avantage théorique du concept de la PDT est la sélectivité de rétention du photosensibilisateur qui permet le traitement sélectif du site tumoral, ce qui par rapport aux autres méthodes réduit les effets secondaires et permet un diagnostic par fluorescence induite. Malheureusement, bien peu de photosensibilisateurs ont une sélectivité pour la tumeur par rapport aux tissus sains et encore ce ratio reste bien modeste.

Les sites anatomiques tumoraux accessibles pour un traitement par la PDT peuvent être classés par groupes (Delaney 1990, Meunier 1992)

2-1- Les tumeurs cutanées et sous-cutanées

Il s'agit des métastases cutanées de cancer du sein, des carcinomes basocellulaires ou épidermoïdes, des mélanomes, du mycosis fongoides ainsi que les sarcomes de Kaposi (Dougherty 1986, Bandieramonte 1984). On ne doit cependant pas considérer cette liste comme exhaustive.

2-2-Les tumeurs de la sphère ORL (tête et cou).

Ces tumeurs sont en majorité des carcinomes épidermoïdes. Les premiers résultats ont été rapportés par Wile (1984) et Grossweiner (1987).

Une étude originale a été réalisée au Centre Alexis Vautrin à Nancy, sur des patients porteurs de lésions néoplasiques de la sphère ORL, les résultats obtenus étaient intéressants en particulier pour les récives tumorales en sites irradiés (Meunier, 1992).

2-3-Les tumeurs du système nerveux central

Laws et son équipe (1981) ont réalisé une étude de faisabilité de phase I sur les tumeurs cérébrales. La PDT peut être appliquée en tant que traitement adjuvant aux patients porteurs de glioblastomes cérébraux (Kaye 1987, Muller 1987).

2-4-Les tumeurs oculaires

La PDT a été plus pratiquée sur les mélanomes choroïdiens (Bruce, 1989). Des réponses complètes ont été enregistrées chez les patients portant des lésions de petite taille ou de taille moyenne ($<1\text{ cm}^3$). Pour des mélanomes pigmentés choroïdiens, aucune réponse complète n'a été observée (Murphree et Gomer, 1979).

2-5- Les tumeurs bronchiques

Les premiers essais cliniques utilisant l'HpD concernaient la détection des tumeurs endo-bronchique (Lipson 1966). La PDT a été utilisée en tant que traitement palliatif (Pass 1989, Balchum 1985) ou curatif (Edell 1987, Hayata 1984) dans les tumeurs

bronchiques. Le carcinome in situ semble constituer une excellente indication (Nelson 1990).

2-6- Les tumeurs des tractus œsophagien et gastrointestinal

2-6-1-Les tumeurs œsophagiennes

En 1987 Thomas et son équipe ont traité des cancers avancés de l'œsophage, une amélioration nette de la dysphagie a été observée. Aida et Hirashima (1983) ont traité des carcinomes superficiels de l'œsophage avec un bon résultat, au moins à court terme.

2-6-2- Les tumeurs gastriques

La PDT est une bonne indication thérapeutique pour les tumeurs gastrique au stade précoce (Hayata 1985).

2-7- Les tumeurs du tractus génito-urinaire

Les premiers essais ont été réalisés par sur des carcinomes transitionnels de la vessie (Kelly et Snell, 1976 ; Tsushiya 1983 ; Hisazumi 1983 ; Benson 1986). En raison du caractère multifocal de ces lésions, l'illumination de tout le volume vesical est nécessaire (Benson 1986).

2-8- Les tumeurs gynécologiques

2-8-1-Les tumeurs du vagin, de la vulve, du col utérin

De rares cas isolés, anecdotiques ont été rapportés (Dahlman 1983, Corti 1989).

2-8-2-Les tumeurs de l'ovaire

Delaney (1990) a rapporté 3 cas de récurrences de cancer de l'ovaire. Immédiatement après la chirurgie de réduction tumorale le traitement PDT a été délivré dans la cavité péritonéale. Il s'agissait d'une étude de phase I.

3-La photodétection en PDT

Le dépistage des cancers à un stade précoce a motivé le développement de la photodétection en PDT. L'émission de fluorescence des photosensibilisateurs retenus sélectivement au niveau du site néoplasique pourrait servir à préciser la localisation (et l'extension) d'une tumeur non visible par les autres méthodes diagnostiques.

CHAPITRE II

LES CONCEPTS PHOTOCIMIQUES ET PHOTOPHYSIQUES

La photochimie est l'étude expérimentale ou théorique des manifestations chimiques et physiques des états électroniquement excités produits soit par excitation optique directe, soit par transfert d'énergie, soit encore par excitation électrochimique (Lemaire, 1972). L'activation de la réaction photochimique est caractérisée par l'absorption d'au moins un photon.

1-Absorption électronique

Le processus d'absorption électronique peut être décrit comme étant la collision d'un photon avec l'électron d'un atome ou d'une molécule entraînant la promotion d'un électron dans une orbitale inoccupée telle que l'énergie qui la sépare de l'état fondamental représente l'énergie du photon. La molécule est dite alors excitée électroniquement, elle a assimilé l'énergie cédée par le photon :

$$E=h\nu$$

h =constante de Planck

ν =fréquence du photon

2- Description des états excités électroniques

Par absorption directe d'un photon de fréquence ν , la molécule passe à l'état excité singulet S_1 ou plus précisément à certains niveaux vibrationnels S_n (diagramme de Jablonsky figure II. 2). Par rapport à l'état fondamental S_0 la molécule possède l'énergie cédée par le photon $E=h\nu$. La molécule excitée libère son excédent d'énergie par fluorescence, par conversion intersystème ou par échange d'énergie vibrationnelle avec des molécules voisines non excitées.

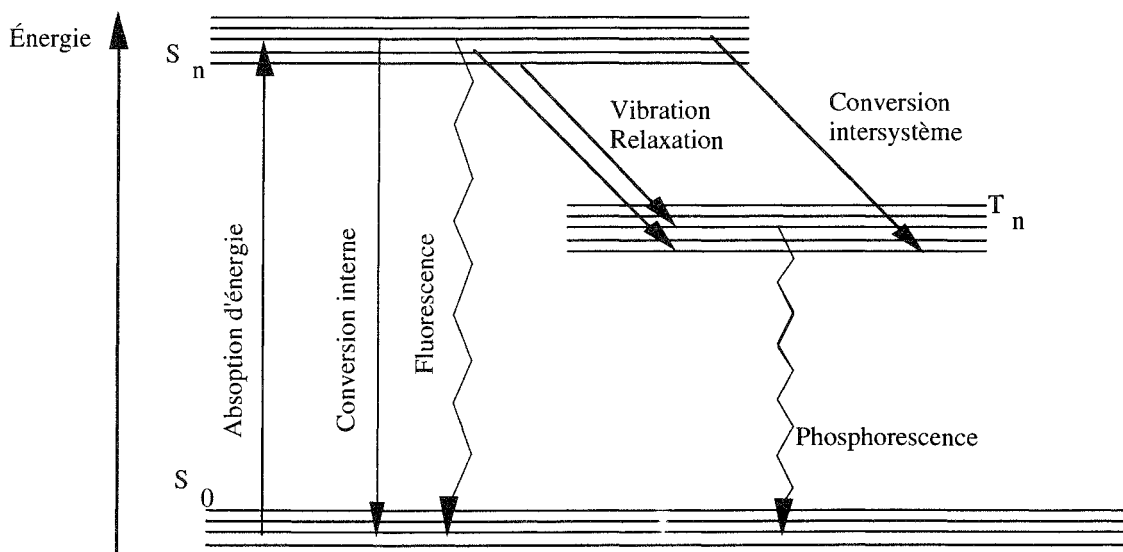


figure II. 1 : Représentation des états excités moléculaires électroniques : diagramme de Jablonsky

3-Processus de désactivation de l'état singulet

3-1- Processus non radiatifs

Les processus non radiatifs comprennent la relaxation vibrationnelle, la conversion interne et le processus de transition intersystème qui a une vitesse très compétitive avec tous les processus de désactivation de l'état singulet. La molécule est en fin de parcours piégée dans le niveau d'énergie le plus bas du niveau triplet. Elle a une durée de vie beaucoup plus longue que celle du singulet excité. L'état triplet est la forme chimique intermédiaire active pour la PDT, sa durée de vie est de 10^{-3} à 10 secondes.

3-2- Processus radiatif : émission de fluorescence

La durée de vie d'un état excité singulet est courte : 10^{-11} à 10^{-6} secondes. L'émission de fluorescence est un processus de retour à l'état fondamental : la molécule dans l'état excité émet un photon à la fréquence ν' , l'électron retrouve son orbitale d'origine et la molécule retourne à son état fondamental. La fluorescence est une transition radiative entre états de même multiplicité.

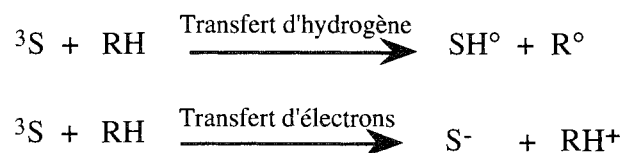
Ce processus photophysique est exploité dans le domaine de la PDT pour la photodétection des tumeurs (Light Induced Fluorescence=LIF) (Bjorkman D.J. 1991, Baumgartner *et al*, 1987).

4-Réactions photochimique impliquées en PDT

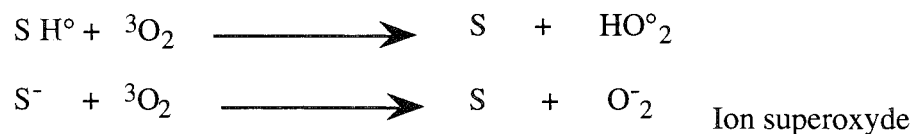
La thérapie photodynamique repose sur le principe d'activation du photosensibilisateur par la lumière. L'état électronique triplet du photosensibilisateur est la forme chimique intermédiaire qui en présence d'oxygène conduit à la production d'agents cytotoxiques responsables de l'effet thérapeutique. Les réactions photochimiques avec les porphyrines peuvent être de trois types différents (Laustriat, 1986).

4-1- Réactions de type I

Ce sont des réactions de type radicalaire, le photosensibilisateur excité réagit directement avec le substrat en produisant des radicaux libres, chargés ou neutres. Ces réactions consistent soit en un transfert d'hydrogène vers le photosensibilisateur et la formation de radicaux libres neutres soit en un transfert d'électron avec la formation d'une forme ionique chargée.

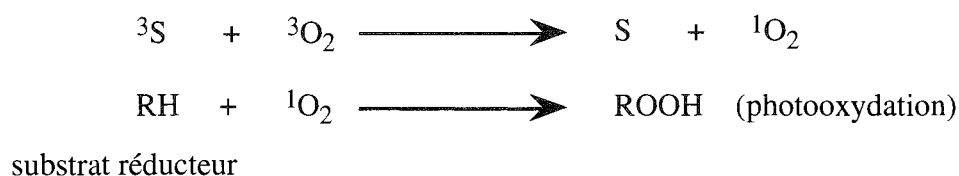


Les radicaux neutres ou chargés réagissent avec l'oxygène moléculaire pour donner des agents de photooxydation puissants :

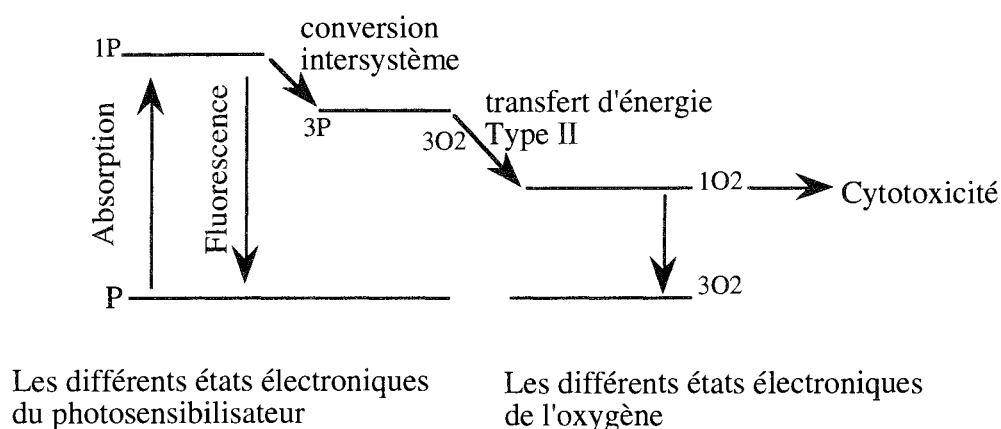


4-2- Réactions de type II

C'est le mécanisme moléculaire prédominant dans les milieux biologiques oxygénés. On a largement rapporté que la phototoxicité des sensibilisateurs était dépendante de la concentration en oxygène (Mac Robert 1989)



Dans les réactions de type II, l'hématoporphyrine à l'état triplet échange son excédent d'énergie avec l'oxygène moléculaire qui a la particularité d'être à un état triplet dans son état fondamental. La réaction conduit à la production d'un état électronique excité de l'oxygène : l'oxygène singulet, une forme très réactive dans les systèmes biologiques (Mac Robert 1989).



${}^1\text{P}$ =état singulet du photosensibilisateur

${}^3\text{P}$ =état triplet du photosensibilisateur

P =état fondamental singulet du photosensibilisateur

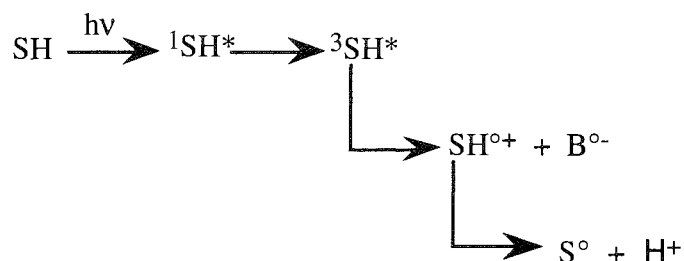
${}^1\text{O}_2$ = l'oxygène singulet

${}^3\text{O}_2$ = l'oxygène triplet

La proximité de transfert de l'énergie résonante de l'état triplet des photosensibilisateurs vers l'oxygène moléculaire peut être très efficace et le rendement en oxygène singulet peut être similaire à celui de l'état triplet du photosensibilisateur. Un autre aspect important de ce mécanisme est la possibilité du retour du photosensibilisateur à son état fondamental. Ainsi, l'oxygène singulet cytotoxique peut être généré sans aucune transformation chimique du photosensibilisateur qui peut à nouveau absorber un autre photon et répéter le cycle. En effet, les molécules de photosensibilisateurs sont capables de générer une concentration en oxygène singulet de plusieurs fois supérieure à leur propre concentration initiale. Ceci peut être un moyen très efficace de potentialiser

Pour mettre en évidence la prédominance du mécanisme de type II au niveau de la photosensibilisation cellulaire, Valenzo (1987) a réalisé des essais *in vitro* avec des piègeurs d'oxygène singulet et a constaté que l'effet cytotoxique était complètement annihilé.

Des conditions très spécifiques sont requises pour ce type de réactions qui ne nécessitent pas l'intervention de l'oxygène. Il surviennent en milieux anaérobie ou dans des milieux où une concentration en réactifs très élevée s'oppose à l'effet de l'oxygène. Le processus photochimique qui peut se produire en présence des photosensibilisateurs dans un système biologique est représenté sur le schéma suivant :



$\text{SH}^{\circ+}$, $\text{B}^{\circ-}$, S° = espèces radicalaires réactives

Ce type de réaction est très peu cité dans les mécanismes photochimiques responsables de la cytotoxicité des porphyrines. Les deux premiers mécanismes semblent être les plus importants avec une prédominance certaine pour les mécanismes de type II.

CHAPITRE III

LA LUMIÈRE

1- Les sources de lumière utilisées

1-1- Les lampes

Les lampes à gaz type xénon, halogènes ou vapeur de mercure sont utilisées pour les traitements PDT. La lumière émise est filtrée pour sélectionner la longueur d'onde adéquate pour l'activation du composé photosensibilisateur ainsi que pour éliminer les composantes infrarouge.

De par leur faible intensité (généralement d'environ 50 mW), les lampes présentent des limites d'utilisation (Wilsone *et al* 1986).

1-2- Les lasers

L'introduction des lasers et des fibres optiques, a favorisé le développement de la thérapie photodynamique. On dispose d'une puissance élevée et grâce aux fibres optiques, on peut atteindre quasiment tous les sites de l'organisme par voie interstitielle ou endoscopique.

Parmi les différentes sources laser pouvant être utilisées, sont citées :

- le laser à hélium-néon : il délivre une lumière rouge à une longueur d'onde de 632,8 nm. La faible intensité de cette source laser limite son utilisation.

- le laser à colorant : pompé par un laser argon est la source laser la plus communément utilisée. La source du laser argon à 514,5/488 nm peut produire de 5 à 25 W de puissance. C'est le laser de pompe du laser à colorant qui contient un colorant fluide comme le kiton-red ou la rhodamine B dont on peut régler l'émission à 630 nm. La puissance effective pouvant être obtenue avec le laser argon-colorant est de 3 à 4W dont 80% peuvent être transmis via une fibre optique.

-le laser krypton : émet à 407 et 413 nm, dans le bleu-violet. Cette longueur d'onde correspond à la bande de Soret du spectre d'absorption du noyau tétrapyrrolique et induit une fluorescence de la molécule susceptible d'être utilisée en photodiagnostic.

-le laser Yag doublé-colorant : émet en mode pulsé, il présente la technologie fiable du laser solide (doublage de fréquence par KTP)

1-3 Les diodes laser

Les diodes laser sont relativement peu onéreuses avec un coût d'entretien négligeable, une grande fiabilité et une petite taille qui leur permet d'être transportées facilement.

Actuellement, les diodes courantes, peuvent générer jusqu'à 1 W de puissance à des longueurs d'onde comprises entre 750 et 800 nm. Cet intervalle spectral est très intéressant pour l'utilisation de photosensibilisateurs de seconde génération (bactériochlorine α). Le développement des diodes laser fait que les longueurs d'ondes disponibles deviennent tous les jours de plus en plus nombreuses.

2- Distribution de la lumière dans les tissus.

2-1- Les tumeurs superficielles

Pour les tumeurs superficielles comme les tumeurs de la peau ou de la cavité bucale, un système optique de lentilles peut produire un spot uniforme.

2-2- Les tumeurs intraluminales ou intracavitaires

Pour les illuminations des tumeurs intraluminales ou intracavitaires comme les tumeurs des bronches, de l'œsophage ou de la vessie, une fibre optique munie d'un embout diffuseur peut être introduite à l'intérieur du canal d'un endoscope et amenée sous contrôle de la vue au site à traiter. Des diffuseurs spécifiques ont été conçus pour l'œsophage et les bronches afin d'obtenir une illumination homogène dans des conditions reproductibles.

2-3-Mode de distribution de la lumière

Pour contrôler la distribution spatiale de la lumière les extrémités des fibres optiques sont modifiées (Marijnissen 1985, Muller 1987). Les embouts diffuseurs sont sphériques ou cylindriques isotropiques (Arnfield 1986).

Pour traiter un volume tissulaire beaucoup plus étendu, on peut augmenter la puissance du laser et la surface de diffusion de la fibre optique ou/et implanter plusieurs fibres simultanément par voie interstitielle (Marijnissen, 1992).

Dans le cadre de l'unité de recherche en thérapie photodynamique de Nancy, des diffuseurs implantables destinés à l'irradiation interstitielle ont été réalisés et une technique d'injection angulaire du faisceau laser dans la fibre optique permet de modifier le profil de diffusion en sortie de la fibre optique (D. Lignon, 1990).

3- Dosimétrie de lumière

Les unités de mesure sont exprimées en terme de densité de puissance de lumière incidente par rapport à la surface (Irradiance en W/cm^2) ou en terme de densité d'énergie par rapport à la surface (Fluence en J/cm^2).

Pour prédire un effet photodynamique, le reproduire ou faire des essais comparatifs, une connaissance approfondie de la distribution spatiale de la lumière et de la dose d'énergie absorbée par les tissus doit être acquise. Des mesures directes au niveau de la tumeur doivent être effectuées (Marijnissen 1987).

Un modèle tumoral expérimental (souris nudes-tumeurs HT29) a été développé au sein de l'unité de recherche en thérapie photodynamique de Nancy, il a permis d'expérimenter et de valider plusieurs aspects dosimétriques :

- l'absorption lumineuse dans les tissus biologiques grâce à un modèle statistique simulant l'évolution photonique dans une masse tissulaire qui a été ensuite conforté par des mesures expérimentales (Diebold 1991, Meunier 1991).

- l'atténuation lumineuse mesurée par un capteur à fibres optiques à partir de la lumière rétrodiffusée (Abdul Nour, 1994)

La distribution de la lumière peut être évaluée en étudiant la distribution de la fluence totale sur un modèle de transport des radiations (Patterson 1991a, Patterson 1991b).

Un dispositif de dosimétrie en temps réel adapté au traitement des cancers de la vessie a été élaboré au sein de l'unité de recherche en thérapie photodynamique de Nancy (D. Lignon, 1993). Ce dispositif est inspiré de la mesure dosimétrique sur trois méridiens (Marijnissen *et al* 1989). C'est un système de capteurs multiples et d'une source isotrope positionnés par un système mécanique introduit à l'aide d'un cystoscope modifié. Un module électronique permet l'acquisition des flux lumineux issus des capteurs et un programme informatique permet à l'opérateur de centrer la source de lumière et de reconstruire la vessie sous forme d'une cartographie des niveaux des flux lumineux atteignant la paroi.

LES PORPHYRINES ET LEURS DÉRIVÉS

1- Introduction

Les porphyrines sont connues pour jouer deux rôles importants en photobiologie : dans le règne végétal avec l'implication de la chlorophylle dans le phénomène de la photosynthèse et leur rôle en clinique humaine pour la photothérapie et la photochimiothérapie.

Jusqu'à présent, pratiquement les seuls photosensibilisateurs utilisés en clinique sont les porphyrines et leurs dérivés. Ces composés existent naturellement dans le corps humain. Les porphyrines, excitées par la lumière, présentent des propriétés de toxicité et de fluorescence.

2- Structure chimique des porphyrines

Les porphyrines sont des molécules planes formées de 4 noyaux pyrroles. La molécule présente une zone centrale vide de 7 Å de diamètre pouvant loger un ion métallique. Cette structure chimique offre des propriétés photochimiques très intéressantes et un large spectre d'absorption de la lumière. La chimie de ces composés est fascinante et la variabilité du métal central offre à la nature plusieurs pigments indispensables à la vie. Les complexes métal-porphyrine sont essentiellement : l'hémoglobine, la myoglobine et les cytochromes (Fer-Porphyrines) tandis que les complexes métal-chlorine sont représentés dans la nature par la chlorophylle (Magnésium-Chlorines).

Plusieurs formes mésomères ont été identifiées et la forme la plus stable possède un azote tertiaire ($=N^-$) sur les noyaux II et IV et deux azotes secondaires ($-NH^-$) sur les noyaux I et III. Les positions périphériques sont numérotées de 1 à 8. Les positions interpyrrolytiques sont appelées «mésos» et sont désignées par α , β , γ , δ (figure IV.1).

La structure plane de la molécule est due aux fortes liaisons π -électron dans le macrocycle. C'est la présence symétrique des quatre atomes d'azote qui permet de former des complexes métalliques des porphyrines. Pour accepter l'ion métallique, la molécule libère ses deux atomes d'hydrogène et le métal en position centrale respecte

une symétrie électrostatique avec les quatre azotes auxquels il est relié par des liaisons de coordination équivalentes (Kamalov 1985). Cette structure chimique fait que les porphyrines sont très thermostables (jusqu'à 300 à 400 °C).

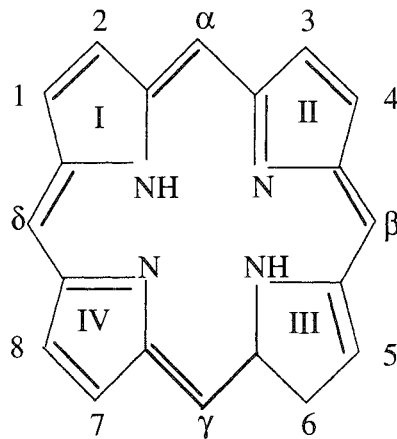


figure IV.1 : structure chimique des porphyrines

En substituant les positions périphériques par des chaînes latérales diverses, plusieurs dérivés peuvent être obtenus. Les substituants généralement rencontrés peuvent être les radicaux :

- méthyle (-CH₃) sur les carbones 1, 3, 5, 8
- vinyle (-CH=CH₂) sur les carbones 2, 4
- carboxyméthyle (-CH₂-COOH) ou carboxyéthyle (-CH₂-CH₂-COOH) sur les carbones 6 et 7.

Le résultat ainsi obtenu est constitué de diverses porphyrines dont quelques monomères identifiés sont présentés sur la figure IV.2.

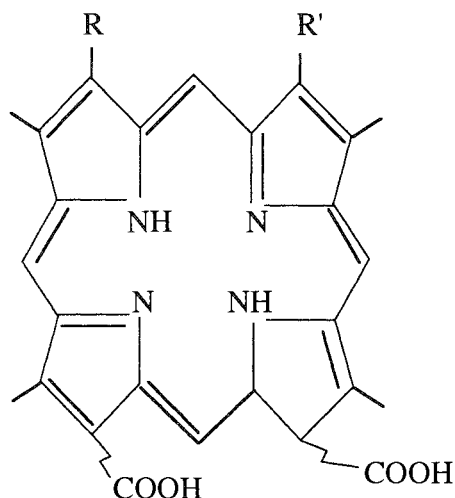


figure IV.2 : Structure de base des monomères

$R=R' = \text{CH(OH)CH}_3$	Hématoporphyrine IX (Hp)
$R=R' = \text{CH(OH)CH}_3\text{-CH-CH}_2$ (HVD)	Hydroxy-éthyl-vinyl-deutéroporphyrine
$R=R' = \text{CH=CH}_2$	Protoporphyrine IX (Pp IX)

Certains de ces dimères tels la dihématoporphyrine éther ou ester ont été identifiés et sont désignés sous l'abréviation de «DHE» (figures IV.3, IV.4).

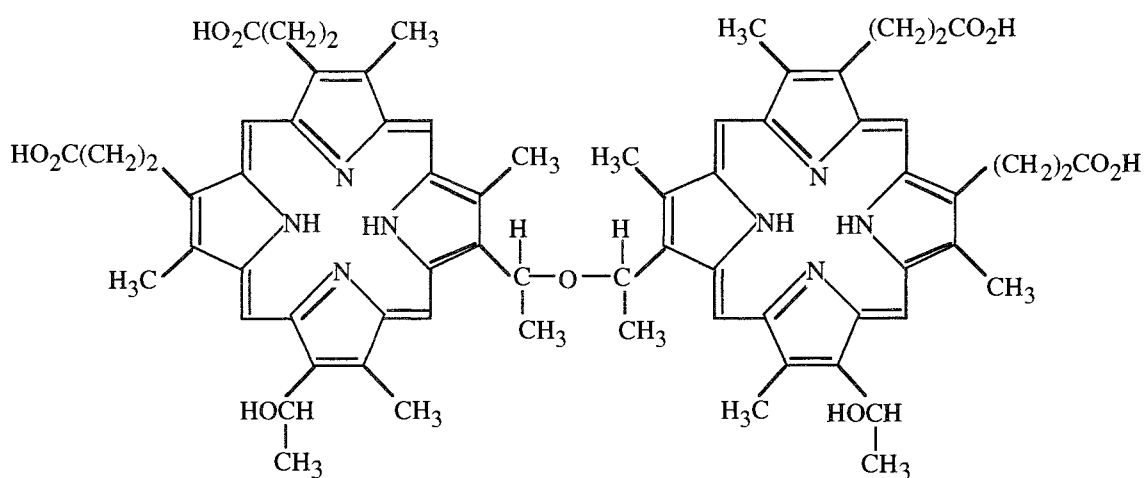


figure IV.3 : Structure de la dihématoporphyrine éther (D.H.E)

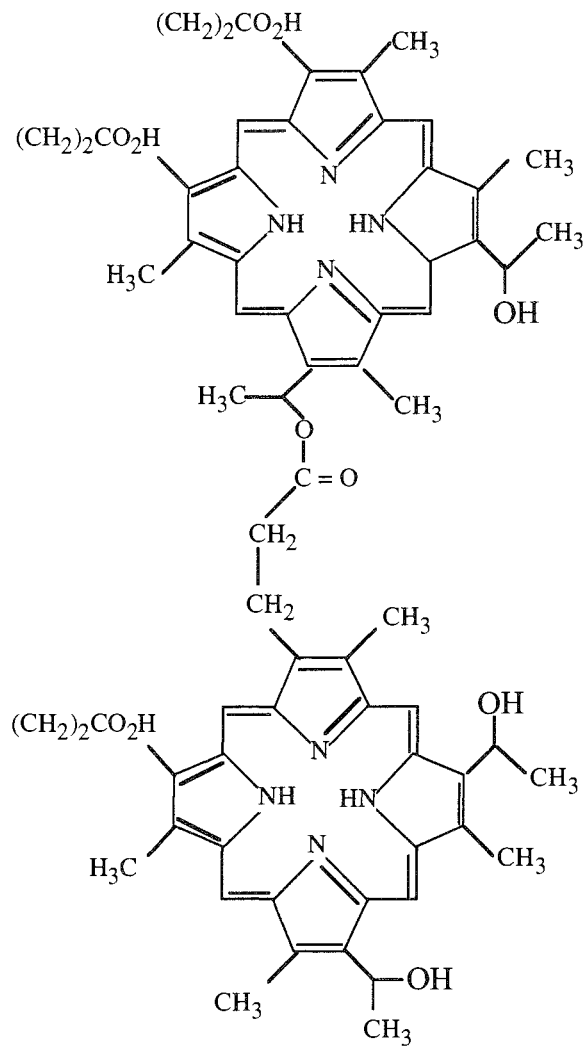


figure IV.4 : Structure chimique de la dihématoporphyrine ester

3- Synthèse chimique des porphyrines

3-1- L'hématoporphyrine

Le traitement chimique de l'hémoglobine par un acide minéral, fournit deux fractions distinctes de la molécule :

- une fraction protéique : la globine
- un groupement prosthétique : l'hème avec un fer ferreux.

L'oxydation de l'hème transforme le fer de son état ferreux à son état ferrique et produit l'hématine qui est très stable. L'élimination du fer par un acide donne naissance à la

porphyrine de l'hémoglobine appelée plus communément protoporphyrine et la fixation de molécules d'eau sur ses doubles liaisons vinyliques conduit à l'hématoporphyrine.

3-2- L'hématoporphyrine dérivée (HpD)

L'HpD est obtenue par traitement de l'hématoporphyrine par une acétylation acide avec un mélange d'acide sulfurique et d'acide acétique, suivie d'une alcalinisation avec une solution d'acétate de sodium. Un précipité brun est obtenu et une fois lavé et séché, il est mis en solution dans de la soude puis neutralisé et finalement rendu isotonique par du chlorure de sodium. L'analyse par chromatographie liquide haute performance (HPLC) (figure IV.5) révèle les pics principaux démontre que l'HpD est un mélange complexe de plusieurs composés (Dougherty et Mang 1987) :

- 20 % d'hématoporphyrine (Hp) ;
- 20 à 30 % d'hydroxyéthylvinyldeutéroporphyrine (HVD) ;
- 3 à 5 % de protoporphyrine IX (Pp IX) ;
- 50 % d'une fraction plus hydrophobe mal résolue en chromatographie.

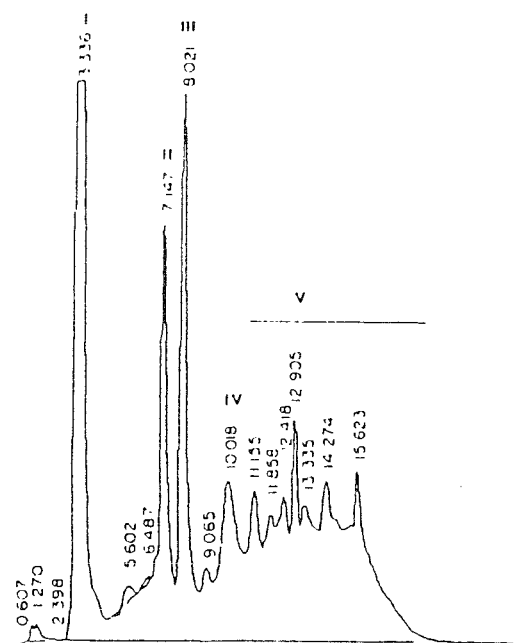


Figure IV.5 : Profil chromatographique d'une solution d'HpD (Queen Elisabeth Hospital) : Hp (I), HVD1 (II), HVD 2 (III), Pp (IV) et DHE (V), (Azzi, 1992)

Cette fraction hydrophobe de l'HpD a été isolée par filtration sur gel (Bio-gel P10, 100-200 mesh). En milieu aqueux, elle est très fortement agrégée et constitue 40 à 50 % de l'HpD préparée selon la méthode décrite par Lipson (Dougherty 1984) sa composition chimique consisterait en deux hématorporphyrine-éther liées en 2 ou en 4 par leur groupement hydroxyéthylvinyl et désignées sous le nom de dihématorporphyrine éther (DHE).

En utilisant une filtration sur gel (Bio-gel P10, 100-200 mesh) avec des solvants organiques, il a été possible de séparer cette fraction en deux composantes nommées A et B. Kessel en 1986 a réalisé un clivage réducteur sélectif des liaisons esters en utilisant un réactif qui ne réduit pas les liaisons éthers, il a observé que la fraction A consistait exclusivement en des dihématorporphyrines esters, alors que la fraction B contenant du matériel non réduit, est probablement composée de dihématorporphyrine-éthers. Dans une solution d'HpD, le rapport des porphyrines éther ou esters dépend de la méthode de synthèse.

La fraction oligomérique étant composée de dimères et d'oligomères liés de façon covalentes par des bases ester et éther a tendance à s'agréger en milieu aqueux par des liaisons non covalentes. Sous cette forme agrégée, l'HpD n'est ni fluorescente ni un bon générateur d'oxygène singulet (Dougherty 1987). Par contre dans les solvants organiques ou en présence de sérum, la désagrégation de la fraction hydrophobe est favorisée et le rendement en oxygène singulet est comparable à celui de l'hématorporphyrine.

En résumé, l'HpD et le DHE ou Photofrin® sont composés d'Hp, d'HVD et de Pp IX qui sont moins actifs en tant que photosensibilisateurs *in vivo* et d'une fraction hydrophobe composée de porphyrines reliées par des liaisons éther ou ester et formée de deux (dimères) à 6 (oligomères) unités de porphyrines. Le photofrin II étant une fraction de l'HpD, on l'assimilera dans le texte à l'HpD.

Dans le cadre des recherches entreprises au sein de l'unité de recherche en thérapie photodynamique, une méthode de synthèse de l'HpD à partir d'hématies humaines adultes a été mise au point. Pour tenter de définir la partie la plus active de l'HpD, elle a été séparée par HPLC analytique en deux ou trois fractions selon leur hydrophobicité et leur temps de rétention sur la colonne.

La fraction hydrophobe (DHE) a été séparée, elle constitue 73% du composé et son activité cytotoxique comparée à celle de la solution mère d'HpD est supérieure (Azzi, 1992, 1993). Les études en HPLC ont montré que l'HpD et à moindre degré sa fraction oligomérique étaient des mélanges complexes de porphyrines ce qui rend leur étude particulièrement difficile.

4- Propriétés spectroscopiques des porphyrines

4-1- Spectre d'absorption

Les porphyrines en solution absorbent la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques dont les maxima (pics) caractéristiques permettent leur identification. En règle générale, toutes les porphyrines ont un spectre électronique similaire avec quatre pics d'absorption dans la bande du visible dites bandes Q et un important pic aux alentours de 400 nm à la limite entre l'ultraviolet et le visible que l'on désigne par le terme de bande de «Soret». Un spectre d'absorption typique est présenté sur la figure IV.6. Le spectre d'absorption des porphyrines est le résultat de quatre transitions électroniques différentes, deux formant la bande de Soret (V) et les deux autres apparaissent dans le visible et concernent la bande I et III. Les bandes II et IV sont par contre d'origine vibrationnelle (Kamalov 1985). Quel que soit le solvant utilisé, l'allure du spectre d'absorption reste la même et le rapport d'intensité entre les différentes bandes est respecté. Cependant, la position des pics peut être légèrement décalée d'un solvant à l'autre.

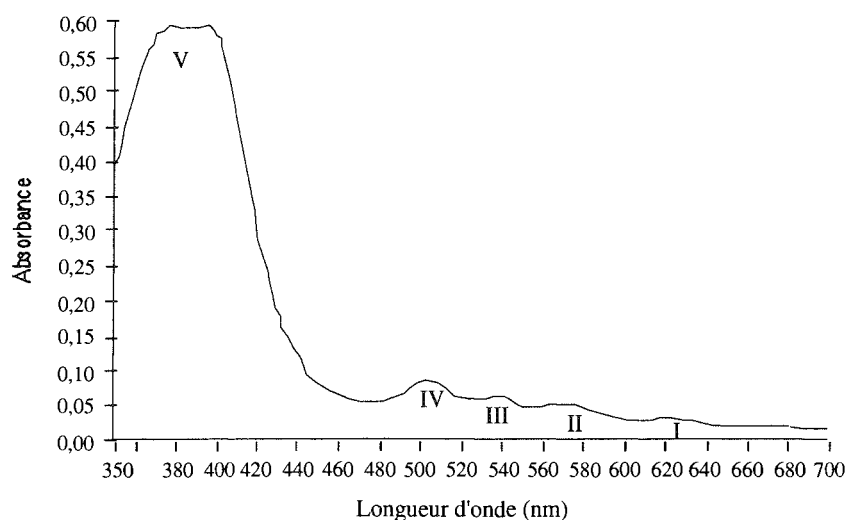


figure IV.6 : Spectre d'absorption d'une solution d'HpD (5 µg/ml) dans du tampon phosphate (PBS, pH 7,4)

4-2- Spectres de fluorescence

Une autre propriété photophysique des porphyrines non-métalliques est leur fluorescence qui est essentiellement due à la présence des liaisons π -électron sur le macrocycle.

4-2-2 Spectre d'émission

Quel que soit la longueur d'onde d'excitation, les spectres d'émission de fluorescence des porphyrines montrent deux pics distincts de fluorescence situés pour le premier à 610 et 630 nm et pour le second entre 670 et 690 nm. Un spectre typique d'émission de fluorescence est représenté figure IV.7.

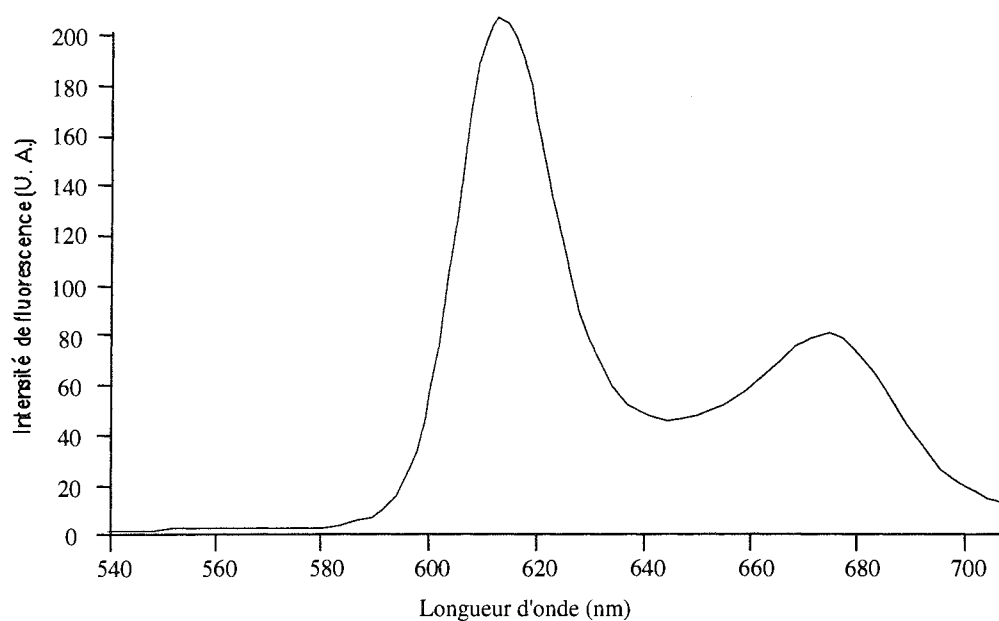


figure IV.7: Spectre d'émission de fluorescence d'une solution d'HpD (5µg/ml) dans du tampon phosphate (PBS, pH 7,4)

4-2-1 Spectre d'excitation

L'excitation de fluorescence de l'HpD peut être effectuée en excitant les divers pics d'absorption du composé. Un spectre typique d'excitation de fluorescence d'une solution d'HpD dans du tampon phosphate (PBS) à pH 7,4 est représenté sur la figure IV.8, les différents pics sont situés à 395, 500, 537 et 557 nm.

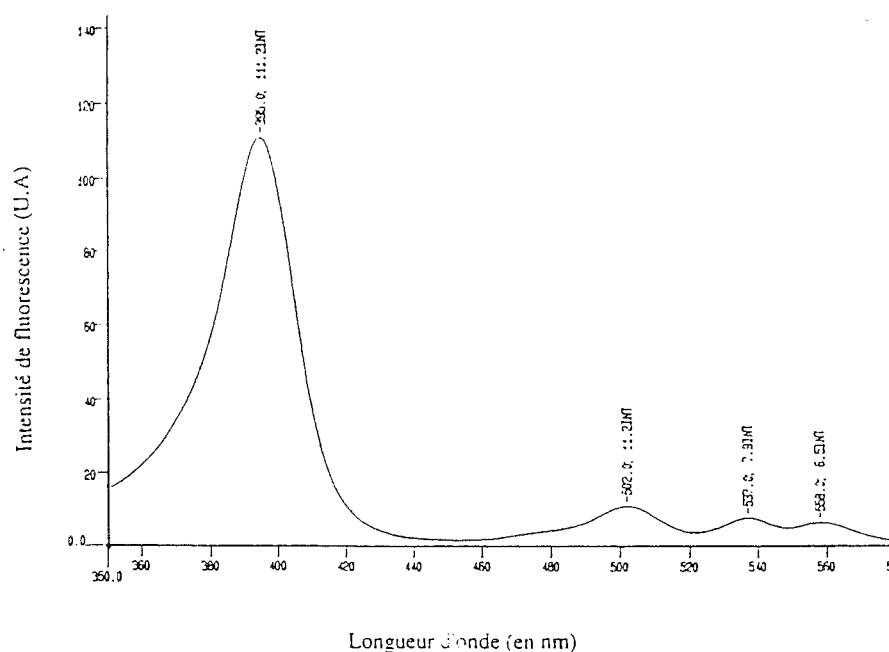


figure IV.8: Spectre d'excitation de fluorescence d'une solution d'HpD (5 µg/ml) dans du tampon phosphate (PBS, pH 7,4)

4-3- Effets physiques du milieu sur l'absorption d'une molécule

De par leur structure chimique, la forme sous laquelle les porphyrines existent en solution dépend de la nature du solvant et de sa capacité à céder des protons. Elles peuvent subir soit une ionisation acide soit une protonation de leurs atomes d'azote.

Selon les propriétés acides ou basiques des porphyrines, leur propriétés spectroscopiques peuvent ainsi être légèrement différentes.

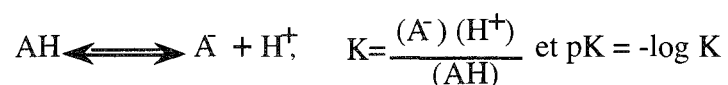
4-3-1- Effet du solvant

Les structures vibrationnelles du spectre d'absorption peuvent être influencées par les interactions avec le solvant, l'interaction universelle (effet de la constante diélectrique du solvant) ou l'interaction par liaisons hydrogène. Ces effets peuvent modifier notablement un spectre d'absorption.

4-3-2- Effet du pH

Le pH peut modifier la nature de l'état fondamental d'une molécule et induire des modifications du spectre d'absorption.

On rappelle que dans un système de type :



TRANSPORT, LOCALISATION ET SÉLECTIVITÉ DES PORPHYRINES

1- Transport et localisation des porphyrines

La nature des porphyrines circulantes déterminerait leur mode de transport et leur localisation dans les tissus. Les porphyrines circulantes peuvent être distinguées selon trois groupes (Jori 1989, Korberlik 1991) :

a) les porphyrines agrégées : telles les oligomères qui forment des structures micellaires. Ce sont des porphyrines non liées et sont prélevées par les macrophages, les cellules endothéliales et les cellules néoplasiques.

b) Les porphyrines monomériques : (essentiellement l'hématoporphyrine) sont liées à l'albumine et aux globulines. Ils ont une faible affinité pour les protéines qui les transportent et sont libérées au niveau des tissus par simple relargage au niveau de la matrice extracellulaire.

c) Les oligomères et les esters d'hématoporphyrine : sont liés aux lipoprotéines et sont incorporés dans la cellule néoplasique par endocytose via des récepteurs membranaires aux lipoprotéines. Ces porphyrines sont ensuite relarguées dans le cytoplasme et se lient à la matrice endocellulaire apolaire (Jori 1984, Jori 1987, Kessel 1986).

2- Sélectivité tumorale des photosensibilisateurs

La plupart des photosensibilisateurs sont distribués et retenus aussi bien par les tissus normaux que par les tissus néoplasiques. Néanmoins, dans certains modèles tumoraux de rongeurs ainsi que certaines lésions malignes de la peau et du cerveau chez l'homme, une faible sélectivité tumorale a été démontrée.

2-1- Influence des protéines du sérum sur la sélectivité tumorale

2-1-1-Composés Hydrophobes

La découverte d'un transport préférentiel des porphyrines hydrophobes par les lipoprotéines du sérum humain (Reyfmann 1984, Jori 1984), pourrait aider à la compréhension des mécanismes d'incorporation des porphyrines par les tumeurs. L'expression supérieure des récepteurs à LDL dans les cellules malignes par rapport aux cellules normales est sans doute un facteur important favorisant la concentration de l'HpD dans les tissus tumoraux.

7 à 8 heures après administration par voie systémique, les photosensibilisateurs hydrophobes comme les oligomères et les esters de porphyrines, se lient initialement à l'albumine et aux lipoprotéines (HDL et LDL) de façon équivalente. Au-delà de 8 jours, les porphyrines sont exclusivement liées aux HDL (Jori 1987, Dougherty 1987).

2-1-2-Composés Hydrophiles

Les composés hydrophiles comme l'hématoporphyrine ainsi que les autres composés monomériques de formes pseudomicellaires ou de structure non covalente se complexent préférentiellement avec l'albumine et les globulines.

2-2- Influence des facteurs vasculaires au niveau des tumeurs

Les tumeurs produisent des facteurs angiogènes qui stimulent le développement de la vascularisation à leur périphérie (Folkman 1986). La perméabilité anormale des vaisseaux sanguins tumoraux peut favoriser l'incorporation des photosensibilisateurs dans la tumeur (Underwood 1972, Ackerman 1978, Matsumura 1986).

Le drainage lymphatique au niveau des tumeurs pourrait être réduit ou ralenti (Feldman 1986). Les macromolécules et les lipides qui se trouvent dans l'espace interstitiel ne sont que faiblement recyclés dans le système sanguin (Courtice 1963). Les protéines dont le poids moléculaire est compris entre 15 000 et 70 000 se trouvent localisées dans cet espace interstitiel tumoral à une concentration cinq fois plus élevée que dans le sang (Matsumura 1986).

En revanche, Jain (1987, 1988) a évoqué le problème de l'importante pression interstitielle et de la faible pression microvasculaire pour l'incorporation des médicaments dans les tumeurs.

2-3-Influences du pH sur la sélectivité tumorale des porphyrines

Les porphyrines peuvent s'incorporer dans les cellules par simple diffusion passive à travers la membrane plasmique (Dellinger 1986). Ce mécanisme de diffusion dépend principalement de certains paramètres physicochimiques tels l'hydrophobicité et la charge électrique de la molécule diffusante. Ces deux paramètres peuvent être modifiés par l'équilibre acido-basique du milieu et par conséquent par la valeur du pH.

La différence majeure entre les tumeurs solides et les tissus normaux environnants est leur apport nutritionnel. En effet, la croissance rapide et excessive des tumeurs produit une insuffisance en oxygène. Par conséquent, le glucose emprunte la voie métabolique anaérobie qui le transforme en acide lactique. La production et la consommation des protons pendant le mécanisme énergétique anaérobie ne sont pas équilibrés et l'excédent d'acide qui est produit à l'intérieur des cellules est déversé dans le milieu extracellulaire. Ceci a pour effet d'acidifier le milieu interstitiel tumoral. La différence entre tissu normal et tumoral peut atteindre jusqu'à 0,5 unité de pH et peut même être supérieure en cas d'administration de glucose.

Brault (1990) a rapporté que l'acidité des tumeurs augmentait l'incorporation des porphyrines à l'intérieur des membranes cellulaires et par conséquent jouerait un rôle dans la rétention intratumorale sélective des porphyrines. D'autres auteurs ont démontré *in vitro* qu'une valeur de pH faible favorisait l'incorporation de l'hématoporphyrine et de l'hématoporphyrine dérivée dans les cellules en culture (Moan 1980, Böhmer 1985).

L'acidité des tumeurs favorise la rétention des porphyrines avec des groupements fonctionnels carboxyliques. D'autre part, l'équilibre de protonation des chaînes d'acide propionique des porphyrines peut également influencer leur affinité pour les membranes cellulaires (Brault 1990).

2-4- Influences de la composition du stroma et de la matrice tissulaire des tumeurs

La plupart des carcinomes humains sont caractérisés par des stromas relativement rigides et de volume important. Ce stroma est essentiellement constitué de collagène. Or les porphyrines présenteraient une affinité pour les protéines de cette matrice de soutien

constituée essentiellement par : les protéoglycanes, la fibrine, l'élastine et le collagène. La concentration élevée de ces protéines dans les tissus tumoraux pourrait par conséquent être impliquée dans la localisation sélective des porphyrines (Gullino 1963).

2-5-Les différentes méthodes proposées pour améliorer la sélectivité tumorale

Au vu des données citées précédemment, il apparaît important de développer des procédures d'administration du photosensibilisateur qui favorisent son interaction avec les LDL.

Les solutions proposées sont l'incorporation du photosensibilisateur dans des liposomes constitués par des phospholipides qui gardent leur structure solide dans les conditions de température physiologique (telle la dipalmitoyl-phosphatidylcholine) et qui interagissent spécifiquement avec les LDL mais pas avec les HDL ou l'albumine sérique (Jori 1983). L'addition de 10 à 15% de cholestérol à la bicouche lipidique du liposome augmente de façon très significative l'accumulation du photosensibilisateur par les liposomes. De plus, si le sensibilisateur est suffisamment hydrophobe, aucune trace détectable du produit n'apparaît dans la matrice aqueuse (Reddi, 1987).

Pour améliorer l'incorporation d'HpD dans des tumeurs cutanées, Notter *et al* (1992) ont proposé des niosomes composés d'héxadécyléther de triglycerol (47,5 %), de cholestérol (47,5 %) et de dicétylphosphate (5%). Liée à ces niosomes, l'HpD ne traverse ni la peau normale ni la peau débarassée de son stratum corneum (Ferrando *et al* 1990). Kennedy (1990) a également proposé pour les lésions cutanées l'administration topique de l'acide 5-aminolévulinique (ALA), un précurseur de synthèse de la protoporphyrine endogène.

La sélectivité tumorale peut également être améliorée par le couplage du photosensibilisateur à des anticorps monoclonaux spécifiques d'une tumeur donnée (Mew 1983).

3-Biodistribution des porphyrines dans les tissus et les cellules

Pour étudier la biodistribution et la pharmacocinétique des photosensibilisateurs, l'une des méthodes les plus appropriées est le marquage radioactif qui ne modifie ni les propriétés photophysiques et photochimiques des molécules ni leurs caractéristiques biologiques (Bellnier 1989).

L'étude de la pharmacocinétique de l'HpD marquée au ^{14}C a été réalisée par Henderson en 1992 qui a démontré, après administration par voie intrapéritonéale chez la souris, que la clairance sanguine se faisait selon une cinétique tri-exponentielle avec des demi-vies d'élimination de 4h, 9 jours et 36 jours

3-1- Dans les tissus et les organes

Les analyses pharmacocinétiques d'HpD marquée par le ^{14}C et le tritium ont démontré une accumulation supérieure dans les tissus expérimentaux tumoraux par rapport à la peau, au muscle, au cerveau et au poumon mais moindre que dans les organes du système réticuloendothélial comme le foie, le rein et la rate (Gomer 1979, Wilson 1989).

Ces résultats démontrent que les photosensibilisateurs ont une grande affinité pour les organes du système réticulo-endothélial constitué de macrophages libres ou fixés aux tissus comme les cellules de Kupffer du foie et les cellules de la rate. Les éléments sanguins semblent par ailleurs en être complètement dépourvus en dépit de l'importante concentration des porphyrines circulantes.

Bellnier en 1989 a remarquablement démontré sur des souris portant des tumeurs greffées sous la peau que la concentration en photosensibilisateur au niveau de la peau recouvrant la tumeur est significativement comparable à celle de la tumeur alors qu'elle est nettement inférieure ailleurs.

3-2- Distribution subcellulaire des porphyrines

3-2-1- Influence de la nature chimique des chaînes secondaires et de la charge des porphyrines

Woodburn en 1991, a étudié par microscopie laser confocale sur deux lignées cellulaires de gliome la distribution subcellulaire de dix porphyrines différant par leur degré d'hydrophobicité et par leur charges électriques. Après un temps d'incubation de 24 h, la distribution est en général cytoplasmique pour toutes les porphyrines.

Sandberg et Romso (1980) ont montré les porphyrines avec des chaînes cationiques dominantes se localisent dans les mitochondries tandis que les porphyrines à caractère plus anionique se localisent au niveau des lysosomes.

3-2-2- Influence du degré d'agrégation des porphyrines

Schneckenburger 1988 a tenté d'élucider la différence de distribution cellulaire de dérivés des porphyrines en fonction de leur taux d'agrégation.

A l'aide d'un microscope de fluorescence relié à une caméra vidéo intensificatrice et à un système de traitement d'image, la fluorescence des porphyrines apparaissait essentiellement au niveau de la membrane plasmique, du cytoplasme et de la membrane nucléaire.

En comparant les résultats obtenus avec des porphyrines de différentes natures avec ceux obtenus avec des dérivés de porphyrines connus pour être riches en composantes oligomériques, il a constaté une intensité similaire de fluorescence dans la partie centrale des cellules ainsi qu'une fluorescence beaucoup plus faible au niveau de la membrane plasmique. L'incubation avec le PHE (polyhématoporphyrine éther essentiellement dimérique et oligomérique) démontre une intensité beaucoup plus faible sur différentes zones cellulaires avec une absence complète de fluorescence au niveau de la membrane plasmique.

Ceci suggère que la désagrégation des espèces dimériques-oligomériques ne se fait donc pas au niveau de la membrane plasmique et que seules les espèces monomériques y sont retenues. L'incorporation cellulaire des espèces agrégées se fait par pinocytose et seule une petite partie des agrégats est monomérisée ou dimérisée à l'intérieur des cellules.

En augmentant le temps d'incubation des porphyrines avec les cellules (de 7 à 24h), la fluorescence est nettement plus prononcée dans la membrane nucléaire et autour d'elle plusieurs spots distincts de fluorescence apparaissent. Ceci démontre que la migration des molécules de porphyrines se passe dans le sens de la membrane plasmique vers la membrane nucléaire et des sites intracellulaires adjacents probablement les mitochondries et les autres organelles (Schneckenburger 1988).

3-3- La distribution subcellulaire de l'HpD

L'HpD ne peut être exclusivement classée dans l'une ou l'autre des catégories citées précédemment en raison de sa composition physico-chimique.

Dans les conditions physiologiques, l'HpD est composée d'un mélange de porphyrines parmi lesquelles on trouve des monomères, des dimères, des oligomères et une fraction

fortement agrégée. Moan en 1983 a démontré que les monomères et les dimères étaient retenus très rapidement (en moins d'une demi-heure) par les cellules mais qu'un simple lavage avec un milieu contenant du sérum pouvait les faire disparaître. Les oligomères et les agrégats sont eux retenus après des temps d'incubation plus longs (de 4 à 18h) mais sont en revanche beaucoup plus concentrés dans les cellules (Kessel 1986).

L'HpD est distribuée de manière générale dans le cytoplasme avec une localisation un peu plus importante dans la zone périnucléaire et au niveau des lysosomes (Woodburn 1991, Berns 1982, Moan 1982). Moan en 1989 a quantifié cette distribution sur les cellules V79 et a démontré que 14% d'HpD était localisée dans les mitochondries et 63% dans la fraction cellulaire soluble. Shulok (1990) a par ailleurs confirmé ces données par microscopie de fluorescence.

LES AUTRES PHOTOSENSIBILISATEURS

1-Introduction

Les propriétés requises pour un photosensibilisateur sont essentiellement (Bonnet 1989, Gomer 1989) :

- la pureté et la stabilité chimiques ;
- la faible toxicité en absence de lumière ;
- une absorption importante de lumière à des longueurs d'onde supérieures à 650 nm ;
- un rendement quantique important en réactions photochimiques de type I et de type II ;
- une localisation tumorale sélective ;
- une clairance rapide au niveau des tissus sains.

Les dérivés des porphyrines présentent une faible absorption dans les ondes spectrales rouges et une persistance de la photosensibilisation cutanée pendant plusieurs semaines.

Plusieurs équipes développent actuellement une seconde génération de photosensibilisateurs tels (Van Hillegersberg 1994) :

- les phtalocyanines ;
- les chlorines ;
- les bacteriochlorines ;

-l'acide amino-lévulinique a (ALA) précurseur de la biosynthèse de la protoporphyrine IX.

2- Les phtalocyanines

Les phtalocyanines (PC) sont des porphyrines synthétiques, les groupements pyrroles sont étendus par condensation avec des cycles aromatiques externes et pontés avec des «aza-nitrogens». L'élongation du chromophore conjugué lui donne une meilleure

absorption au niveau des bandes Q et plus particulièrement entre 675 et 700 nm (Rosenthal 1991).

Selon Ben-Hur et Rosenthal (1985, 1986) les processus photodynamiques engendrés par les PC n'impliquent probablement pas l' $^1\text{O}_2$. Langlois (1986) a démontré par ailleurs que la voie photochimique majoritaire empruntée par une série de métallophtalocyanines était la réaction de type II. Ces observations démontrent que le rôle l' $^1\text{O}_2$ en PDT est encore très controversé.

Brown (1986) a comparé les effets photodynamiques et les dommages causés sur le foie de rat par l'AIPCS à 675 nm avec ceux de l'HpD à 630 nm et a constaté que malgré une meilleure profondeur de pénétration de la lumière à 675 nm, les effets obtenus avec l'HpD et avec l'AIPCS étaient très comparables. L'AIPCS ne semble pas induire de photosensibilisation cutanée à la lumière ambiante (Tralau 1987).

3-La méso tétra hydroxyphenyl chlorine (mTHPC)

C'est un produit pur avec une bande d'absorption dans le rouge à 650 nm. La cinétique d'incorporation ainsi que l'activité photodynamique de la mTHPC ont été comparées à celle de l'HpD sur les cellules HT29 d'adénocarcinome de côlon humain. La cinétique d'incorporation des photosensibilisateurs a été mesurée par cytométrie en flux ($\lambda_{\text{excitation}}=488\text{nm}$, $\lambda_{\text{émission}}=560\text{nm}$) et pour les deux photosensibilisateurs elle est directement proportionnelle au temps d'incubation jusqu'à l'apparition d'un plateau à 12 heures. L'efficacité photodynamique a été évaluée par le test de cytotoxicité au MTT après photoirradiation à 630 nm pour l'HpD et à 650 nm pour la mTHPC. Quel que soit le temps d'incubation, l'activité photodynamique *in vitro* de la mTHPC est supérieure à celle de l'HpD (Rezzoug 1995).

D'autre part, la mTHPC aurait une certaine sélectivité vis-à-vis des tissus tumoraux, un rapport tumeur/tissu sain de 10 à 15 a été rapporté et la photosensibilisation cutanée serait de courte durée. Cette chlorine induit une réponse thérapeutique à une concentration de 0,3 mg/kg et une fluence de 10 J.cm^{-2} (Ris *et al* 1991, Ris *et al* 1993 a, Ris *et al* 1993 b). La propriété de fluorescence de la mTHPC en fait un bon candidat pour la détection des tumeurs. Différentes longueurs d'onde peuvent exciter ce produit, 420, 555, 599 et 650 nm. L'émission de fluorescence révèle deux pics distincts à 625 et 652 nm (Wagnières 1992).

4- La bactériochlorine a (BCA)

La BCA est extraite de la chlorophylle de certaines bactéries photosynthétiques (*Chromatium vinosum*, *Rhodospirillum rubrum*) (Beems *et al* 1987, Shuitmaker 1993), c'est un composé ayant 3 pics d'absorption à 360, 525 et 760 nm. Ce dernier pic dans le rouge lointain est très intéressant en raison de la profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus qui est 10 fois supérieure à celle obtenue à 630 nm (Wilson 1985).

En raison de sa lipophilicité qui favorise sa diffusion à travers les membranes, ce produit est très bien retenu par les cellules tumorales (Leengoed 1993). La mesure de fluorescence a montré une meilleure concentration au niveau du tissu tumoral avec un facteur de fluorescence de 2,5 fois supérieur.

Le traitement photodynamique peut être appliqué une heure après injection de la BCA avec des doses de lumière n'excédant pas 100 J.cm^{-2} . La BCA peut également être utilisée à des fins diagnostiques avec une lumière d'excitation à 514 nm qui induit une fluorescence vers 665 nm (Schuitmaker 1993). L'effet de photosensibilisation cutanée observée avec la BCA s'estompe au bout de quelques jours.

Le coefficient d'absorption molaire de la BCA ($32\,000 \text{ M}^{-1}$) est supérieur à celui de l'HpD (1170 M^{-1}). La production d'oxygène singulet et par conséquent l'efficacité photodynamique de la BCA est plus importante que celle de l'HpD (Beems *et al* 1987).

5-L'acide amino-lévulinique α (ALA)

L'ALA est une substance naturelle qui existe dans l'organisme et qui est impliquée dans la voie de biosynthèse de l'hème. Une augmentation de la charge en ALA dans les cellules induit la production endogène de la protoporphyrine IX (PP IX) qui est un photosensibilisateur très actif. La PP IX possède un spectre d'activation similaire à celui de l'HpD. Le principal avantage de ce produit est la possibilité d'administration par voie topique chez les patients porteurs de lésions superficielles de la peau ou de lésions de la vessie. L'ALA appliquée sur la lésion, est convertie au bout de 2 à 3 h en PP IX qui peut être activée en surface par la lumière. Ce traitement a donné des résultats très satisfaisants chez des patients atteints de la maladie de Bowen ou porteurs de carcinome basocellulaire superficiel avec plus de 90 % de réponses complètes (Kennedy *et al* 1990, Cairnduff *et al* 1993). Administrée par voie intraveineuse, l'ALA a démontré une rétention sélective au niveau des muqueuses et la durée de photosensibilisation est d'environ 24 h (Loh *et al* 1992).

Ce photosensibilisateur n'est en revanche pas aussi efficace que l'HpD mais il peut être utilisé par voie topique ce qui supprime la photosensibilisation cutanée. L'ALA est actuellement un sujet de recherche très productif.

EFFET DE LA PDT SUR LES CELLULES ET LES TISSUS

1-Introduction

Les effets cellulaires de la PDT dépendent essentiellement de la présence d'oxygène dans le milieu. L'oxygène singulet qui est l'agent cytotoxique principal, a une durée de vie courte et une distance de diffusion très limitée estimée à environ 0,1 μm (Moan 1990).

Etant donné la large répartition intracellulaire (cytoplasme, membrane plasmique, membrane nucléaire) des photosensibilisateurs, les effets de la PDT peuvent virtuellement affecter toutes les composantes cellulaires.

2-Sites de photosensibilisation et de dommages cellulaires

Les sites de photosensibilisation tout comme les sites de localisation dépendent étroitement de la nature chimique des chaînes secondaires des porphyrines et de leur charge électrique.

2-1- Les photosensibilisateurs lipophiles et anioniques

Ils produisent généralement des dommages au niveau de toutes les structures membranaires cellulaires, qu'elles soient plasmique, mitochondriales, lysosomales, nucléaires ou appartenant aux réticulums endoplasmiques (Moan 1989).

La réaction photodynamique conduit à la peroxydation du cholestérol et des phospholipides insaturés au niveau de la bicouche membranaire. Ceci a pour conséquences de diminuer la perméabilité et la fluidité membranaires et de favoriser une interaction entre les amino-lipides et les polypeptides. Tous ces facteurs qui affectent les propriétés dynamiques de la membrane altèrent l'activité de systèmes enzymatiques reliés aux récepteurs membranaires.

2-2- Les photosensibilisateurs hydrophiles

Ces photosensibilisateurs se localisent préférentiellement au niveau des lysosomes et induisent la destruction de ces structures avec un relargage des enzymes lysosomiales dans le cytoplasme. C'est la voie majeure de cytotoxicité pour les composés hydrophiles. Le cas en est illustré par les travaux de Roberts *et al* (1989 a) et ceux de Moan *et al* (1989) concernant la tétraphénylporphyrine tetrasulfonée (TPPS4).

2-3- Les photosensibilisateurs cationiques

Ils s'accumulent préférentiellement au niveau de la mitochondrie (Salet et Moreno 1990). L'inhibition des enzymes mitochondriales est considérée comme l'action clé conduisant à la mort cellulaire (Gibson *et al* 1989, Salet et Moreno 1990). Cependant, d'autres effets cellulaires précèdent ceux des enzymes mitochondriales tels l'inactivation des enzymes cytosoliques et lysosomales, l'inactivation des systèmes de transport membranaire, la dépolarisation de la membrane plasmique ainsi que l'inhibition des enzymes de réparation de l'ADN (Moan *et al* 1989, Boegheim *et al* 1987, Specht et Rodgers 1990).

2-4- Les photosensibilisateurs lipophiles

En ce qui concerne les photosensibilisateurs les plus lipophiles et les phtalocyanines, différents travaux se sont intéressés aux dommages qu'ils produisaient au niveau de l'ADN (Ramakrishnan *et al* 1989). Moan (1989) a suggéré que les dommages provenaient essentiellement de la membrane nucléaire.

2-5- Les dérivées des porphyrines

2-5-1- L'hématoporphyrine dérivée

L'HpD est connue pour être un mélange complexe de nombreuses espèces hydrophiles et hydrophobes dont le pourcentage est estimé respectivement à 75 et 25% des porphyrines totales (Hilf *et al* 1983). Selon le temps d'incubation des cellules avec ce

photosensibilisateur, la nature des porphyrines retenues et les sites de photosensibilisation diffèrent.

Dans un milieu sans sérum, les cellules leucémiques L1210 incubées avec l'HpD (de 30 min à 1 heure), fixent essentiellement les monomères (Kessel 1986). La phototoxicité de l'HpD dans ces conditions d'incubation est localisée au niveau de la membrane plasmique : altération de son intégrité structurale, de sa perméabilité, détérioration de son système de transport et diminution de son pool d'ATP (Kessel 1986, Dubelman *et al* 1977, Girotti 1979). Si les cellules sont incubées avant photoirradiation dans un milieu contenant du sérum il n'y a plus de toxicité.

Les composés les plus hydrophiles tels les isomères d'Hp et de HVD, même très peu de temps après injection, sont présents dans le cytosol à des taux largement suffisants pour provoquer des dégâts oxydatifs importants au niveau des protéines cytosoliques et plus particulièrement au niveau de la pyruvate kinase (Gibson 1989).

Des temps d'incubation plus longs (4 à 18 heures), conduisent à l'accumulation des composants non-polaires de l'HpD (dimères et oligomères) et la migration des porphyrines de la membrane plasmique vers la membrane nucléaire et les sites intracellulaires adjacents. Les effets phototoxiques observés sont beaucoup plus prononcés et concernent en plus des paramètres déjà cités plus haut, des altérations mitochondriales (Shulok 1986) avec une importante diminution de l'ATP intracellulaire. Ceci a pour effet de compromettre la synthèse de l'ADN. En effet, en utilisant de la thymidine marquée Hilf en 1986 a constaté la relation de cause à effet entre le pool d'ATP cellulaire et la synthèse d'ADN. Kessel a également conclu, que la synthèse de l'ADN est beaucoup plus sensible à une carence énergétique en ATP qu'elle ne l'est à une déficience en acides aminés.

2-5-2- La fraction oligomérique de l'HpD

Composée de 80 à 90% de porphyrines hydrophobes (Dougherty 1987), qui s'accumulent essentiellement au niveau des structures membranaires. Le pourcentage de matériel hydrophile représentant 20 % du matériel total est susceptible de produire suffisamment d'oxygène singulet pour inhiber certaines enzymes cytosoliques telle la pyruvate kinase.

Néanmoins, les effets létaux primaires sont une conséquence immédiate de l'altération membranaire. Henderson et Donovan (1989) ont observé après traitement photodynamique de cellules *in vitro* un relavage du ^{51}Cr qui témoigne d'une complète

désintégration de la membrane. Ils ont par ailleurs remarqué que la «fuite» de l'enzyme cytosolique - la lactate déshydrogénase (LDH) - commençait immédiatement après exposition à la lumière et s'achevait au bout de 30 minutes (Henderson et Donovan 1989).

La photoirradiation induit le relargage de certains médiateurs immunitaires et inflammatoires. Des études sur cultures de cellules ont montré une libération d'eicosanoides (Lim *et al* 1986, Henderson et Donovan 1989) et d'histamine, médiateurs de la réaction inflammatoire. Toutes ces substances sont potentiellement vasoactives et sont à l'origine des dommages vasculaires.

La photosensibilisation des cellules macrophagiques *in vitro*, provoque la libération de TNF (Tumor Necrosis Factor), qui peut causer des dommages vasculaires (Evans 1990).

En conclusion, la phototoxicité sur les cellules normales ou tumorales dépend de la localisation du photosensibilisateur dans la cellule, c'est à dire de ses propriétés de solubilisation.

3- Effets vasculaires

Un effet précoce de la PDT *in vivo* est de nature vasculaire. Les dommages tissulaires microscopiques et macroscopiques ont été rapportés pour l'HpD, les purpurines, la Npe6 (chlorine mono-L-aspartyle e6), les phtalocyanines etc (Reed *et al* 1988, 1989, Nelson *et al* 1988, Morgan *et al* 1990).

En situation clinique, pour la peau érythème et œdème cutanés sont les premiers signes de la réponse PDT. Ces effets sont observés avant l'apparition des dommages visibles des cellules endothéliales, la thrombose et les hémorragies.

La thrombose vasculaire peut survenir immédiatement après exposition des tissus à la lumière et très peu de temps après injection du produit (à l'exception des composés cationiques).

Pour les composés hydrophiles, tels la TPPS4, la photosensibilisation vasculaire est beaucoup plus importante 24 h après injection du produit alors que sa clairance sanguine est très rapide. Ces résultats indiquent une relation entre la solubilité du sensibilisateur, sa libération et/ou sa liaison avec les sites de sensibilisation vasculaires.

Après administration d'HpD, Dougherty et Bellnier (1989) ont démontré la relation entre le taux sanguin circulant et les dommages vasculaires. Chez le rat, si le traitement

PDT est effectué à des taux circulant élevés, la formation d'une thrombose massive ainsi qu'une stase du sang est observée (Reed en 1989).

La conséquence des dommages vasculaires sur le microenvironnement tumoral est importante. On constate rapidement une réduction de la vitesse du flux sanguin ainsi qu'une hypoxie au niveau de certaines fractions cellulaires tumorales (Star *et al* 1986, Reed *et al* 1988, Henderson et Fingard 1987,1989). Ces deux effets s'accroissent pendant et après l'exposition à la lumière.

En raison de la dépendance des processus photodynamiques à l'oxygène, l'hypoxie cellulaire représenterait un facteur limitant. L'hypoxie tumorale est fortement dépendante de la dose de sensibilisateur mais peu de la dose de lumière appliquée. Cet écart à la loi de réciprocité sensibilisateur/lumière, est probablement dû au taux de sensibilisateur circulant restant après injection de fortes doses.

Tromberg 1990 a analysé le changement de l'oxygénation tumorale durant le traitement PDT en implantant deux électrodes à oxygène par voie transcutanée et en mesurant en temps réel l'oxygénation tissulaire. Ces mesures ont permis de distinguer trois étapes :

- l'étape de consommation d'oxygène par les processus photodynamiques.

- l'étape hypoxique où viennent s'ajouter des perturbations du flux sanguin

- l'étape ischémique qui est la conséquence d'une occlusion vasculaire totale et définitive.

Selon la dose de lumière et la quantité de photosensibilisateur dans la tumeur, l'étape hypoxique peut être irréversible. La réversibilité de l'hypoxie pourrait être exploitée pour rétablir l'oxygénation tumorale lors de traitements en doses de lumière fractionnées. Ceci permettrait une reprise du flux sanguin durant l'intervalle de temps séparant deux illuminations (Gibson *et al* 1990). Cependant, tous les cas présentés par Gibson sont des modèles et les changements d'oxygénation pendant la PDT dépendent très fortement de la nature de la tumeur, des doses de lumière et des paramètres de temps. Ainsi, si l'on prend l'exemple du rétinoblastome chez le rat, on constate une augmentation initiale du flux sanguin en réponse à une dose thérapeutique de Pf II-PDT. Les résultats préliminaires rapportés chez l'homme sont controversés et montrent aussi bien une diminution qu'une augmentation du flux sanguin (Horsmann et Winther 1989).

La destruction de la tumeur peut être également constatée sans qu'il n'y ait aucun effet propre au niveau des cellules tumorales. Un effet thérapeutique a été constaté par

exposition des tumeurs à la lumière dès l'injection du sensibilisateur, ce qui correspond à un délai de temps pour lequel le taux sanguin est très élevé et le taux intratumoral est pratiquement nul (Henderson et Fingar 1987). Denekamp (1983) a d'ailleurs rapporté que le simple blocage de l'approvisionnement sanguin de la tumeur, pendant une période de 15 heures induisait une régression totale. L'impact de la destruction du lit vasculaire sur la régression tumorale, a été démontré et le dommage des vaisseaux des tissus sains péri-tumoraux est parfois suffisant pour induire une éradication complète de la tumeur (Fingar et Henderson 1987).

Il est difficile d'identifier exactement les événements qui initient les dommages vasculaires induits par la PDT. En effet, toute perturbation au niveau de la paroi vasculaire peut conduire à une thrombose par une cascade d'événements qui touchent autant l'endothélium vasculaire que les structures de support ou les éléments figurés du sang en particulier les plaquettes.

Alors que l'un des premiers effets de la PDT *in vivo* est l'induction de l'agrégation plaquettaire, l'exposition de plaquettes isolées sensibilisées avec du Pf II et exposées à des doses de lumière proches des conditions cliniques, montre une rapide inhibition de cette agrégation. Les phénomènes montrent l'impact de la PDT sur les cellules endothéliales des capillaires sanguins (Zieve *et al* 1966).

4- Réponse tumorale

La durée de la réponse de la tumeur ou/et des tissus à la PDT dépend des altérations des cellules tumorales et des dommages vasculaires.

In vivo après PDT, un effet immédiat de létalité cellulaire est observé. La réduction du volume tumoral observée ensuite (effets étalés dans le temps) reflète les phénomènes de mort cellulaire retardée du fait de la nature même des lésions sub-cellulaires et des conséquences des dommages vasculaires.

Henderson et Dougherty (1992) ont comparé les effets de la PDT sur les cellules tumorales par test de clonogénicité

- la bactériochlorophylle «a» n'induit pas d'occlusion vasculaire au cours même des 3 à 4 heures suivant l'irradiation, par contre la réduction du nombre de cellules clonogéniques est observée dès la fin du traitement.

- le Pf II, produit une réduction de la clonogénicité d'environ 20 à 30 % alors que l'occlusion des vaisseaux se produit dès les premières minutes d'exposition à la lumière.

- la phthalocyanine (AlPcSn) a un potentiel phototoxique cellulaire élevé (6 fois supérieur à celui du Pf II) et une photosensibilité vasculaire relativement faible. La mort cellulaire qui survient dès la fin de l'exposition à la lumière est au moins 10 fois supérieure à celle qui se produit après l'occlusion des vaisseaux.

Patterson (1990) propose une méthode histologique d'évaluation de la nécrose tumorale. Mais il faut tenir compte du fait que les tissus d'apparence nécrosés peuvent contenir jusqu'à 20 % de cellules clonogéniques viables. Si la méthode histologique peut donner une idée sur l'effet cytotoxique direct sur la tumeur, il ne peut renseigner sur le potentiel curatif du traitement (Fingar *et al*, 1987).

5-Apoptose et thérapie photodynamique

L'apoptose a été démontrée sur différents types de cellules à la suite de traitements par des radiations ionisantes ou par PDT (Kerr *et al*, 1987 ; Agarwal *et al*, 1991). Laukka (1994) a étudié l'apoptose induite par PDT.

Pour les cellules L5178Y-S, l'apoptose contribue de façon importante à la cytotoxicité alors qu'au niveau des cellules SK-HEP-1, les mêmes doses cytotoxiques ne démontrent aucun effet apoptotique.

L'effet d'apoptose induit par PDT a par ailleurs été observé pour d'autres types de cellules tels les lymphocytes, les thymocytes et les cellules épithéliales (Oleinick *et al*, 1993). Cependant, plusieurs lignées cellulaires telles les thymocytes humains (TK6), les fibroblastes de hamster (V79), les fibrosarcomes de souris (RIF-1 et L929), les carcinomes humains (A549 et HSCCa) (Oleinick *et al*, 1993 ; He *et al*, 1993) ont été testées et malgré la cytotoxicité induite par la PDT, aucun effet apoptotique n'a été démontré. La raison de cette différence de réponse entre les lignées cellulaires est inconnue. On ne peut conclure que la cytotoxicité induite par PDT est accompagnée d'un effet apoptotique quel que soit le tissu traité.

6- Les effets secondaires de la PDT

6-1- effet sur la peau

L'un des effets néfastes de la PDT est la photosensibilisation cutanée. Tous les patients ayant reçu un traitement PDT avec l'HpD, demeurent photosensibilisés pendant

plusieurs semaines. Les études précliniques de Bellnier et Dougherty (1989b) ont utilisé comme moyen d'évaluation *in vivo* l'oreille de la souris. Les tests réalisés par Henderson *et al* (1992) sur le modèle de la fenêtre cutanée reflètent également les taux de photosensibilisateurs circulants.

La photosensibilisation cutanée se caractérise par un œdème et un érythème aigus avec, dans les cas extrêmes une nécrose.

Pour éviter la photosensibilité prolongée de la peau, plusieurs procédés peuvent être proposés :

- un procédé photodynamique propose l'élimination du photosensibilisateur par photodestruction (Mang 1987, Boyle et Potter 1987) ;

- l'augmentation de la clairance sanguine par procédé pharmacologique avec des agents absorbants, des diurétiques ou des modificateurs du métabolisme des porphyrines (Manyak *et al* 1988), des «piégeurs» de radicaux libres et d'oxygène singulet comme les caroténoïdes. On a aussi proposé des agents radioprotecteurs contenant des composés sulfhydrylés (Dillon *et al* 1988) comme le WR-2721 et ses dérivés.

Certains nouveaux photosensibilisateurs permettraient d'éviter une photosensibilisation cutanée prolongée. C'est le cas de l'AlPcSn dont la photosensibilisation cutanée induite disparaît au bout de deux semaines (Tralau 1989) pour la métallopurpurine (SnET2) elle dure 9 jours (Morgan 1990), 5 jours pour la bactériochlorine a (bChla) et 24 heures pour la chlorine mono-L-aspartyle e6 (NPc6) (Roberts 1989b, Gomer 1990).

6-2- Effet sur certains tissus

Le traitement PDT à l'HpD ou à l'AlPcSn préserve l'intégrité structurale et fonctionnelle des tissus riches en collagène ce qui permet de maintenir une fonction mécanique normale de certains organes comme le côlon ou la vessie (Barr 1990).

Après PDT l'infiltration lympho-plasmocytaire des tissus montre l'importance de la réaction inflammatoire et suggère une possible réponse immunitaire (Shumaker et Hetzel 1987). Un taux élevé d'interleukine 1-béta, d'interleukine 2 ainsi que de TNF α (Tumor Necrosis Factor α) a été retrouvé dans les urines de patients ayant été traités pour un cancer de la vessie (Nseyo *et al* 1990).

6-3- Effets mutagènes et carcinogènes

Aucun potentiel mutagène statistiquement significatif n'a été observé ni avec l'HpD ni avec l'AlPcSn (Gomer *et al* 1983, Ben-Hur *et al* 1985).

CHAPITRE VIII

PHOTOBLANCHIMENT OU PHOTODÉGRADATION DES PORPHYRINES

1-Introduction

Les termes du «photoblanchiment» ou «photodégradation» sont définis comme étant une réaction de photodestruction autocatalytique du colorant suite à son exposition à la lumière.

Le photoblanchiment pris dans son acception large associant destruction et modification est caractérisé par les modifications spectroscopiques du photosensibilisateur après photoirradiation : réduction de l'absorbance au niveau de certaines bandes spectrales, diminution d'intensité de fluorescence et formation de nouvelles bandes d'émission et d'absorption.

Ces modifications ne sont peut être pas sans conséquences sur les potentialités thérapeutiques et diagnostiques du photosensibilisateur. En effet, la modification du spectre d'absorption modifie la profondeur de pénétration de la lumière et le rendement photochimique (Mang *et al* 1987, Potter *et al* 1987).

Le photoblanchiment peut être exploité pour préserver les tissus sains et pour atténuer la photosensibilisation cutanée (Boyle et Potter 1987, Roberts *et al* 1989, Spikes 1992). On a aussi évoqué la possibilité d'exploiter certains produits de phototransformation absorbant dans le rouge lointain pour améliorer l'efficacité du traitement (Gigiunas *et al* 1991, König *et al* 1992).

2- Processus photochimiques de dégradation

Les porphyrines, les métalloporphyrines ainsi que tous les pigments pyrroliques, induisent leur propre photo-oxydation par un certain nombre de réactions pouvant aller du simple transfert d'électron via les chaînes secondaires d'oxydation, aux réactions oxydatives avec clivage du macrocycle tétrapyrrolique (Krieg et Whitten 1984).

Lors de ce processus, le macrocycle est souvent dégradé par l'oxygène singulet ou à un moindre degré par l'ion superoxyde (via un transfert d'électron de l'état excité triplet des porphyrines) (Krieg et Whitten 1984). En règle générale, les porphyrines sont

converties en produits absorbant très faiblement dans le domaine du visible (Spikes 1992).

3- Processus chimique de dégradation dans le milieu biologique

La molécule serait époxydée au niveau de la double liaison entre l'anneau pyrrole et le pont méthine (Krieg et Whitten, 1984). La forme époxyde des porphyrines serait un produit intermédiaire de l'oxydation de certaines métalloporphyrines avant d'atteindre une structure planaire tétrapyrrolique (Matsuura *et al* 1980, Smith *et al* 1982, Krieg et Whitten 1984). Dans le milieu biologique, la phototransformation des macrocycles dépend de la présence d'acides aminés oxydables ou de protéines. La dégradation ne s'effectue pas directement par l'oxygène singulet mais par les produits d'oxydation qui résultent de l'interaction des substrats oxydables avec l'oxygène.

4-Influence du microenvironnement sur la cinétique de photoblanchiment

Au vu des mécanismes de photodégradation décrits précédemment, on peut s'attendre à ce que les processus soient très différents en solution ou dans un système biologique. En effet, plusieurs auteurs (Krieg et Whitten 1984, Moan 1984) ont démontré que l'HpD est dégradée beaucoup plus rapidement dans les cellules que dans des solutions salines et que les produits de dégradation obtenus sont différents.

De plus dans un même milieu intracellulaire, selon les sites de liaison des porphyrines, la cinétique de photodégradation est différente (Schneckenburger 1988, Rück 1990). Dans le même microenvironnement, les porphyrines hydrophobes sont photoblanchies beaucoup plus rapidement que les porphyrines hydrophiles (Schneckenburger 1988, Rück 1990). Ainsi, une simple modification du microenvironnement induit des variations spectroscopiques importantes.

Le taux de photoblanchiment du l'HpD correspond à une superposition de plusieurs processus ayant des cinétiques plus ou moins rapides selon les différentes composantes chimiques de l'HpD et de l'environnement (Spikes 1992).

Selon Moan la cinétique de photodégradation est de premier ordre, elle ne dépendrait pas de la concentration initiale en porphyrines aussi bien dans les cellules qu'en solution (Moan et Berg 1991, Moan *et al* 1988, Moan 1987). Ceci est une approximation étant donné que l'ordre de la cinétique peut changer quand les temps d'exposition sont très longs (Mang 1987).

Toutes ces données introduisent la difficulté de l'étude du phénomène de photoblanchiment et en particulier pour des photosensibilisateurs complexes comme l'HpD.

4-1-Photodégradation des porphyrines en solution

4-1-1- Influence du degré d'agrégation des porphyrines

La variabilité des résultats obtenus avec les porphyrines a pu être en partie attribuée à leur différent degré d'agrégation dans différents environnements (Laferty 1978, Jori 1980, Dougherty 1983).

Les porphyrines dans leur état excité triplet sont les principaux médiateurs de la réaction photodynamique (Spikes 1975, Bonett 1983). En 1965, Kasha a observé que l'agrégation de certains colorants modifiait leur action photosensibilisatrice et a expliqué cette perte d'activité par une interaction directe entre l'état fondamental et l'état excité singulet, avec pour conséquence une diminution importante du rendement en états triplets. La probabilité d'une transition radiative de l'état singulet du monomère se trouve ainsi affectée par la transition directe du dipole vers les agrégats adjacents avec une fission de l'état excité singulet primaire. L'agrégation peut également affecter le rendement de l'état triplet en produisant un *quenching* statique et non-radiatif de l'état précurseur singulet (Andreoni 1983, Smith 1985).

Cependant d'autres auteurs comme Spikes (1992) n'ont constaté aucune différence majeure entre la durée de vie des états triplets des agrégats et des monomères de l'hématoporphyrine. Les rendements en oxygène singulet sont très peu différents tandis que le rendement en fluorescence est de 2,2 fois supérieur pour les monomères/dimères (Moan 1982).

Rodgers (1983) a constaté une faible différence de rendement en oxygène singulet entre les monomères/dimères et les agrégats et a conclu qu'elle était probablement due au fait que le transfert d'énergie de l'Hp excité vers l'oxygène est contrôlé par un processus de diffusion et que la constante de diffusion pour les agrégats est inférieure à celle des monomères/dimères.

Pour démontrer l'effet de l'agrégation sur le taux de photoblanchiment, Spikes (1992) a étudié dans des conditions de pH et de molarité similaires (7,4 ; 5 μ M) le photoblanchiment de plusieurs porphyrines différentes : l'hématoporphyrine (Hp), le

photofrin II (Pf II), la tetra-(4-sulfonato-phenyl)porphyrine (TSPP) et l'uroporphyrine (Uro).

Dans de telles conditions :

- * PF II est un mélange complexe de monomères, d'agrégats et de dimères/oligomères liés par des liaisons éther et ester ;
- * la solution d'hématoporphyrine contient un mélange de monomères, de dimères non covalents et d'agrégats ;
- * l'uroporphyrine est essentiellement monomérique ;
- * la TSPP est majoritairement dimérique.

Par conséquent, ces travaux permettent la comparaison de systèmes simples comme les solutions d'uroporphyrine et de TSPP à des systèmes plus complexes comme l'HpD et le photofrin II qui contiennent plusieurs espèces moléculaires.

Les résultats rapportés démontrent que le rendement quantique de photoblanchiment le plus important est enregistré avec le photofrin II et l'hématoporphyrine tandis que les plus faibles sont observés pour l'Uro et la TSPP. Il apparaît nettement que les porphyrines les plus photoblanchies sont celles qui sont les plus agrégées. Ceci est totalement contradictoire avec les propriétés énergétiques des agrégats que l'on a citées précédemment.

Les cinétiques de photoblanchiment décrites sont initialement du premier ordre pour l'Hp, la TSPP et l'Uro mais sont modifiées pour des temps d'exposition plus longs. Par contre pour le photofrin II, plusieurs ordres de cinétique apparaissent et suggèrent que les différentes porphyrines composant le mélange peuvent être photoblanchies à des taux variables et par différents mécanismes. En effet, Grossweiner (1982) a démontré que les agrégats de l'hématoporphyrine peuvent induire la photolyse de systèmes membranaires artificiels (liposomes) par un processus photodynamique de type I alors que dans le même système, les monomères et les dimères réagissent principalement selon des réactions de type II.

D'autre part, les faibles rendements en oxygène singulet observés pour l'HpD et le photofrin II par rapport aux agrégats de porphyrines (Moan 1984) peuvent être expliqués par le fait que les agrégats ainsi que les dimères contenus dans l'HpD et photofrin II sont liés de façon covalente (Bonett et Berenbaum 1983, Berenbaum *et al* 1982) contrairement aux agrégats des solutions de porphyrines qui se transforment en monomères ou dimères par simple dilution. Les liaisons covalentes seraient responsables du faible rendement en oxygène singulet obtenu dans ces solutions.

L'effet de du degré d'agrégation des porphyrines sur leur taux de photoblanchiment est très controversé. Dans le cas de l'HpD, les différentes porphyrines composant le mélange peuvent être photoblanchies à des taux variables et par différents mécanismes. Les porphyrines les plus photoblanchies sont celles qui sont les plus agrégées, elles sont photodégradées selon un processus photodynamique de type I alors que dans le même système, les monomères et les dimères réagissent principalement selon des réactions de type II.

4-1-2- Influence des solvants organiques

L'efficacité d'un photosensibilisateur et sa capacité à produire des états énergétiques triplets sont contrôlés par de nombreux paramètres chimiques, dont la polarité du milieu ambiant et le niveau d'agrégation des porphyrines. Le degré d'agrégation des porphyrines est conditionné par les propriétés du solvant dans lequel elles sont dissoutes et en particulier par sa constante diélectrique.

En règle générale, le rendement quantique de photoblanchiment dans diverses solutions organiques (acétone, diméthylformamide, éthanol, formamide, méthanol) est inférieur à celui calculé dans un milieu aqueux tamponné (Spikes 1992).

Aucune corrélation n'a pu être établie entre le rendement quantique de photoblanchiment et la durée de vie de l'oxygène singulet ou la solubilité de l'oxygène dans les solvants. En effet, la durée de vie de l'oxygène singulet est supérieure dans l'acétone par rapport à tous les autres solvants et pourtant le rendement de photoblanchiment de l'hématoporphyrine dans ce solvant est faible. Il en est de même pour les alcools et le diméthylformamide où la concentration en oxygène est supérieure à celle de solutions aqueuses oxygénées alors que les rendements de photoblanchiment y sont beaucoup plus faibles.

Une corrélation a été établie entre le rendement quantique de blanchiment des porphyrines et la constante diélectrique des solvants : les rendements calculés dans des solutions à faible constante diélectrique (tels le diméthylformamide et les alcools) sont beaucoup moins importants que ceux calculés dans les solvant aqueux à forte constante diélectrique. On incrimine la recombinaison des espèces ioniques qui est très favorisée dans les solvants à faible constante diélectrique (Farhataziz et Rodgers 1987).

Dans les solvants à forte constante diélectrique les espèces ioniques intermédiaires ont une durée de vie beaucoup plus longue, ce qui favorise leur participation au processus de photodégradation et l'augmentation du taux de photoblanchiment

4-1-3-Influence de l'oxygène

Spikes (1992) a montré que les porphyrines en solution (Hp, Pf II, et TSPP) pouvaient induire leur propre photodégradation par des réactions faisant intervenir l'oxygène singulet. A partir de ces données il était intéressant de comparer les taux de photoblanchiment obtenus avec ces porphyrines dans deux milieux différents : dans un milieu appauvri en oxygène par passage d'azote, le taux de photoblanchiment a baissé d'environ 10% par rapport au milieu exposé à l'air suggérant le rôle majeur de l'oxygène dans les réactions de photoblanchiment des porphyrines.

Krieg et Whitten (1984) ont également démontré que l'Hp et l'HpD incorporées dans des microémulsions contenant des acides aminés oxydables avaient un taux de photoblanchiment supérieur à celui des porphyrines en solution. Ces produits n'étaient pas photoblanchis en absence d'oxygène. D'autres auteurs ont par contre démontré que l'hématoporphyrine dérivée incorporée dans des liposomes de phosphatidylcholine de jaune d'œuf ou des fantômes d'érythrocytes bovins était photoblanchie au même taux sous des conditions de saturation en oxygène ou en azote et que les réactions qui intervenaient étaient certainement des réactions de type I (Goyal en 1983, Sen et Grossweiner en 1988).

Le processus de photo-oxydation des porphyrines requiert la présence essentielle mais non exclusive de l'oxygène. En effet, l'attaque directe des porphyrines par l'oxygène singulet survient en absence d'autres substrats dans le milieu.

4-1-4-Influence du pH et de la force ionique

La valeur du pH et la force ionique influent sur l'équilibre agrégats-monomères et par conséquent sur les propriétés spectroscopiques des porphyrines. La modification du photoblanchiment des porphyrines en fonction du pH dépend de la nature chimique des porphyrines.

Spikes (1992) a rapporté qu'une diminution du pH de 7,4 à 5 avait pour conséquence une diminution des longueurs d'onde d'absorption de l'hématoporphyrine et de l'HpD traduisant probablement une augmentation du degré d'agrégation de ces porphyrines. En milieu acide, le rendement de photoblanchiment diminue de 70 à 30 %, ce qui suggère que les espèces agrégées sont beaucoup plus résistantes à la photodégradation.

L'augmentation du pH de 7,4 à 11,4 a très peu d'effet sur le photoblanchiment de l'HpD et de l'Hp.

Les effets du pH sur la photodégradation ont été uniquement constatés pour l'Hp et l'HpD qui sont essentiellement des porphyrines hydrophobes, par contre aucun effet n'a été constaté sur l'uroporphyrine et la tétrasulfonatophényl-porphyrine (TSPP) qui sont des porphyrines hydrophiles.

Ainsi, s'il existe une relation entre le pH du milieu et le photoblanchiment des molécules, c'est la conséquence d'une modification de la nature physico-chimique des porphyrines et non un effet direct sur leur processus photochimique de dégradation.

4-1-5- Influence des substrats photo-oxydables

Comme il a été précédemment mentionné, plusieurs types de biomolécules photo-oxydables tels les lipides insaturés, les protéines et les acides nucléiques peuvent interagir avec les porphyrines par différentes voies qui modifient le mécanisme et le rendement de photoblanchiment.

Richard *et al* (1983) ont rapporté que l'hématoporphyrine en présence de sérum albumine humaine (HSA) était photoblanchie beaucoup plus rapidement que dans une simple solution tamponnée. Le même phénomène a été observé en présence de sérum de veau foetal (Roberts *et al*, 1989 ; Bezdetnaya *et al*, 1994).

Krieg et Whitten (1984) ont démontré que le taux de photoblanchiment de la protoporphyrine IX dans les microémulsions était nettement supérieur en présence de substrats photooxydables comme la cystéine, le diéthyl-sulfide, l'histidine, la méthionine ou le tryptophane. Ces mêmes auteurs ont par ailleurs remarqué que les produits de photodégradation des porphyrines en présence de ces substrats sont différents de ceux obtenus en simple solution.

Spikes en 1992 a également étudié l'effet de trois acides aminés différents (histidine, tryptophane et méthionine) sur le photoblanchiment de quatre porphyrines (Hp, Pf II, TSPP, Uro). Il a exprimé leur efficacité de photooxydation par rapport au rendement de consommation de l'oxygène ainsi que par l'accumulation des peroxydes d'hydrogène. En effet, selon la nature et la concentration de l'acide aminé et la nature des porphyrines, le rendement de photoblanchiment pouvait soit augmenter soit diminuer. Les mêmes porphyrines en présence de 0,1 à 1% d'albumine sérique humaine ont montré une nette

augmentation de leur rendement de photoblanchiment (de 2 à 3 fois supérieur à celui obtenu en solution tamponnée) ; ce serait dû à l'intervention des produits de photo-oxydation des protéines par l'oxygène singulet.

Au vu de ces données, l'intervention des substrats photo-oxydables paraît indéniable malgré la divergence entre les résultats cités plus haut.

5-Méthodologies d'étude du photoblanchiment des porphyrines en milieu intracellulaire

Moan a démontré au cours d'irradiation de cellules sensibilisées à l'HpD que le sensibilisateur subissait une photodégradation qui se manifestait par la diminution de l'intensité de fluorescence, la modification des spectres de fluorescence et d'absorption, en particulier l'apparition de nouvelles bandes d'absorption dans le rouge. Ces modifications avaient pour conséquence l'altération du rendement de photoinactivation des cellules (Moan 1984, 1986).

5-1-Méthodes spectroscopiques

Les méthodes spectroscopiques d'étude du photoblanchiment les plus utilisées sont l'émission de fluorescence et l'excitation de fluorescence. Le spectre d'absorption des porphyrines intracellulaires ne peut être enregistré que pour des concentrations en photosensibilisateur élevées.

Moan a étudié les spectres d'excitation et d'émission de fluorescence dans les cellules NHIK 3025 (provenant de carcinome humain *in situ*) ayant été sensibilisées pendant 18h avec du Pf II à différentes concentrations (Moan 1986, Moan *et al* 1988).

5-1-1-Spectrométrie d'absorption

Les modifications spectroscopiques dues au photoblanchiment des porphyrines sont caractérisées par une diminution de l'absorption au niveau de la bande de Soret et de certaines longueurs d'onde appartenant au domaine spectral du visible.

A des concentrations très élevées, il est possible de suivre la décroissance de l'absorption spectrale des porphyrines intracellulaires. La cinétique de la diminution de

la bande de Soret (vers 405 nm) est plus lente que la décroissance de la fluorescence intégrale émise (Moan 1987, Moan 1988, Moan 1991, Bezdetnaya *et al* 1994).

L'exposition de l'Hp et de l'HpD à la lumière fait apparaître de nouveaux pics d'absorption vers 640 et 660 nm. La formation de ces photoproduits relativement stables pourrait être exploitée en PDT en raison de leur absorption au niveau de régions spectrales à haute transmission tissulaire (Strečkyte et Rotomskis 1993, Giniunas *et al* 1990).

5-1-2 Spectrométrie de fluorescence

5-1-2-1-l'émission de fluorescence

Dans des cellules non-photoirradiées, les pics d'émission de fluorescence de l'HpD et du Pf II se situent à 630 et 695 nm. Quand les cellules sont exposées à la lumière, ces spectres varient considérablement (Moan *et al* 1988) et l'intensité de fluorescence intégrale diminue avec la durée d'exposition à la lumière selon une cinétique exponentielle et avec une constante de décroissance très peu dépendante de la concentration des porphyrines intracellulaires (Moan 1986, Moan 1987).

Le spectre d'émission de fluorescence des cellules photoirradiées révèle par ailleurs de nouveaux pics à des longueurs proches de 640-650 et 665-670 nm. Moan (1986, Moan *et al* 1988) a interprété l'apparition de ces pics comme la simple conséquence d'un changement d'environnement des porphyrines qui induirait le déplacement des pics originaux vers le rouge (red-shift) mais les changements de propriétés spectrales observés après photoirradiation sont aussi la conséquence d'une modification physicochimique de l'HpD.

Cependant, des études plus récentes sur solutions aqueuses d'HpD (Konig 1990, Dietel *et al* 1990, Aveline 1992) ont démontré qu'un nouveau pic de fluorescence localisé à 642 nm apparaissait après photoirradiation. La présence de piègeurs d'oxygène singulet tel l'azide de sodium réduit fortement la formation de ce produit fluorescent, ce qui laisserait supposer qu'il est le résultat de l'interaction de l'oxygène avec l'état triplet de l'HpD.

De plus l'oxygène singulet est également responsable de la photodestruction propre de ce photoproduit fluorescent. En 1988, En Hua *et al* ont également rapporté l'existence d'un autre pic de fluorescence vers 460 nm dans les cellules tumorales S180 (cellules d'ascites humaines).

Au vu des données obtenues par ces différents auteurs il paraît difficile de retenir uniquement la théorie de Moan, l'apparition de ces nouveau pics est bien le résultat d'une phototransformation et pas uniquement celui d'une modification de l'environnement chimique des porphyrines.

5-1-2-2- l'excitation de fluorescence

Durant l'exposition à la lumière, l'intensité de la bande de Soret (vers 405 nm) diminue en fonction du temps d'exposition (Reddi *et al* 1981 ; Moan et Vistnes 1986, Moan *et al* 1986, Moan *et al* 1988). La cinétique de décroissance de la bande de Soret suit un processus de dégradation de premier ordre qui signifie que l'oxygène singulet produit via les porphyrines sensibilisées oxyderait les protéines et acides aminés de son environnement. Ceux-ci une fois oxydés endommageraient uniquement la première molécule de porphyrine génératrice du phénomène.

La liaison des porphyrines aux protéines augmenterait non seulement le photoblanchiment des porphyrines mais également la dégradation des protéines liées. Le phénomène de destruction des protéines membranaires augmenterait le taux relatif des porphyrines dans un environnement purement lipidique. Le rétrécissement de la bande de Soret après photoirradiation témoignerait de la photodestruction des sites de liaison protéique et de l'obtention d'un environnement beaucoup plus homogène (essentiellement lipidique) pour les molécules fluorescentes (Moan, 1988).

5-2-Altération du rendement de photoinactivation des cellules

Moan (1987) a montré que la modification des spectres de fluorescence due à l'exposition à la lumière était accompagnée d'une diminution du rendement de photoinactivation des cellules. Il a calculé les courbes de survie des cellules sensibilisées à deux concentrations différentes de Pf II (0,4 et 12,5 µg/ml) puis exposées à différentes fluences d'une lumière émettant entre 340 et 420 nm. Il a constaté que la courbe de survie des cellules ayant été incubées à faible concentration (0,4 µg/ml) était déplacée vers des valeurs de fluences supérieures (figure VIII, 1). Ainsi, la photodégradation du photosensibilisateur dans les cellules aurait pour conséquence de nécessiter une dose de lumière supérieure pour atteindre un même effet cytotoxique donné. La dose requise semblerait alors être supérieure à la dose théorique calculée selon les bases dosimétriques de dépendance entre la lumière et le photosensibilisateur.

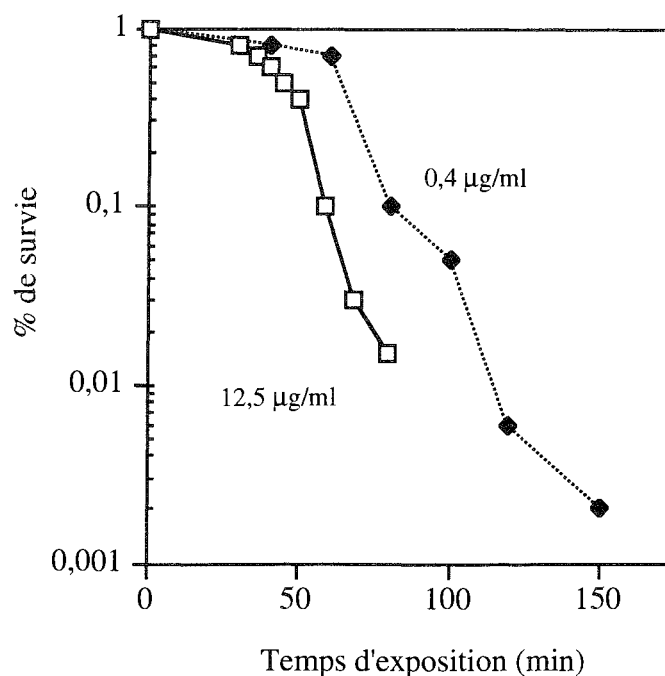


Figure VIII, 1 : Courbe de survie des cellules NHIK 3025 exposées à la lumière après 18 heures d'incubation avec 0,4 ou 12,5 µg/ml de photofrin (Moan 1984,1986).

5-3- Relation entre la peroxydation lipidique et la photodégradation des porphyrines cellulaires

Une irradiation en lumière ultra-violette ou visible, induit le photoblanchiment de la protoporphyrine, de l'hématoporphyrine et de l'HpD dans les cellules (Reyftmann *et al* 1986, Morlière *et al* 1987, Schneckenburger *et al* 1988). La cinétique complexe de photoblanchiment révèle clairement l'hétérogénéité de distribution des porphyrines dans les cellules (Morlière *et al*, 1987). Le photoblanchiment des porphyrines est plus prononcé dans la membrane plasmique que dans le noyau (Schneckenburger *et al*, 1988).

Ainsi, la peroxydation photoinduite des lipides membranaires semble être impliquée dans le phénomène de photoblanchiment des porphyrines (Reyftmann 1986, Morlière *et al* 1987).

Candide (1988) a appuyé cette hypothèse en utilisant *in vitro* des lipoprotéines (LDL) normales ou délipidées chargées d'HpD et de protoporphyrine et en démontrant l'interaction de la peroxydation lipidique sur le photoblanchiment des porphyrines.

La photosensibilisation des cellules par les porphyrines a pour conséquence l'apparition d'une importante émission de fluorescence vers 400-500 nm. Cette fluorescence est due

à des produits de pigments lipofuschines qui sont des bases de Schiff conjuguées, formés à partir de groupements amine et de malonaldehyde provenant de lipides polyinsaturés peroxydés (Kohen *et al*, 1984 ; Reyftmann *et al*, 1986 ; Morlière *et al*, 1987). Il est très intéressant de noter que ces produits ne sont pas formés uniquement durant l'exposition à la lumière mais que le phénomène se poursuit après l'arrêt de la photoirradiation ce qui indique l'intervention de chaînes de réactions radicalaires induite par la peroxydation des lipides.

6-Etude du photoblanchiment *in vivo*

6-1-Dosimétrie et photoblanchiment

Le processus photodynamique requiert l'action combinée de la lumière, des composantes actives du photosensibilisateur et de l'oxygène.

En PDT, les approches de dosimétrie sont théoriquement basées sur la quantité d'énergie effective absorbée par l'HpD localisée dans les tissus. Cowled et Forbes (1985) ont noté que pour un effet biologique équivalent, la dose de DHE injectée et la dose de lumière variaient de façon inverse. Fingar en 1987, a précisé que cette règle était respectée tant que des doses de lumière importantes n'étaient pas utilisées avec des doses de photosensibilisateur très faibles.

Durant l'exposition à la lumière, les dérivés des porphyrines sont photochimiquement détruits (Moan *et al*, 1984 ; Mang *et al*, 1987 ; Potter *et al*, 1987). Ce processus est mis en évidence par la réduction des quantités de photosensibilisateurs extraits des tissus ainsi que par la perte de la fluorescence induite *in vivo* chez l'homme ou la souris.

Grossweiner en 1986 et Potter en 1987 ont statué sur le fait qu'un résultat thérapeutique probant ne pouvait être obtenu que si des doses limites supérieures étaient bien respectées.

Ils ont démontré que la concentration de photosensibilisateur présente dans le tissu, en un point donné diminuait de manière exponentielle selon la dose de lumière absorbée.

$$C(J_0) = C_0 \exp (-\beta J_0) \quad (1)$$

J_0 représente la dose de lumière incidente absorbée (en $J.cm^{-2}$) C_0 est la concentration initiale du photosensibilisateur et $C(J_0)$ est la concentration du photosensibilisateur.

La constante de décroissance (β) est exprimée en $\text{cm}^2.\text{J}^{-1}$.

Cette décroissance exponentielle de la quantité de photosensibilisateur extraite des tissus a été calculée au niveau d'une tumeur expérimentale de carcinome mammaire de souris d'épaisseur inférieure à 3 mm (SMTF) et illuminée uniformément (630 nm, 75 mW/cm^2). La fluorescence des tumeurs *in vivo* suit la même décroissance exponentielle. Ces deux méthodes donnent dans ces conditions expérimentales une constante $\beta = 0,004 \text{ cm}^2.\text{J}^{-1}$ (Potter et Mang 1984, Mang *et al*, 1987).

6-2-Concept du photoblanchiment et son application dans les études *in vivo*

La photodestruction des porphyrines a été observée aussi bien sur tumeurs spontanées humaines qu'au niveau de tumeurs expérimentales.

Si l'on considère les impératifs dosimétriques, une photodestruction du produit aurait pour conséquence directe une destruction tumorale incomplète (Moan *et al* 1984, Moan *et al* 1987, Moan 1986, Mang *et al* 1987, Barr *et al* 1990, Patterson *et al* 1990).

Si la concentration des porphyrines dans les tumeurs est supérieure à celle des tissus sains avoisinants, le photoblanchiment pourrait atténuer la phototoxicité induite au niveau des tissus sains, sous réserve d'une dosimétrie correcte (Boyle et Potter 1987, Potter *et al* 1987). Ce raisonnement est juste, mais l'absence de gradient de concentration des porphyrines (HpD ou sa fraction oligomérique) entre tumeur et tissus sains limite son application en clinique.

7-La phototransformation des porphyrines

7-1-Identification physico-chimique des produits de la phototransformation

La modification du spectre d'absorption de l'HpD due à la formation des photoproduits concerne plus particulièrement une diminution de l'intensité des bandes d'absorption caractéristiques du mélange et l'augmentation de l'absorption intégrale dans le rouge avec l'apparition d'une bande à 663 nm et d'un épaulement entre 645 et 650 nm (Aveline, 1992).

L'analyse HPLC des solutions irradiées montre que les composés formés par photodégradation de l'HpD en milieu organique sont principalement les photoproduits des porphyrines vinyliques principalement les chlorines dont la nature chimique explique l'apparition de la bande d'absorption à 663 nm et celle de l'épaule à 645 nm.

D'autres produits de la phototransformation de l'HpD avec une nouvelle bande d'absorption vers 642 nm ont été observés. Leur nature chimique a été déterminée par diverses méthodes et ils présenteraient des caractéristiques spectroscopiques comparables à celles des espèces agrégées et plus particulièrement avec les formes dimériques (König *et al*, 1990). Leur formation est conditionnée par la présence de structures auto-associées de type sandwich qui consistent en deux structures dimériques dont les deux composantes cycliques se superposent et sont liées par des liaisons π - π , les deux substituants 2 et 4 des cycles peuvent également intervenir au niveau de la surface d'interaction. Cette hypothèse a été confortée par des essais sur des solutions micellaires où ces associations en type sandwich sont détruites et où la formation des photoproduits est totalement inhibée. La structure en «Sandwich» des dimères de porphyrines est représenté sur la figure VIII.2 (Strečkyte et Rotomskis, 1993).

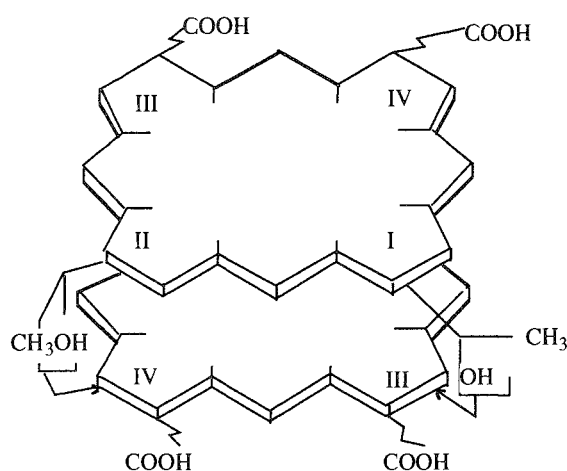


Figure VIII.2 : Structure en «Sandwich» des dimères de porphyrines

7-2-Intérêt biologique des produits de la phototransformation

Compte tenu de la moindre absorption des tissus dans le rouge et dans le proche infra-rouge, la formation de ces nouveaux photoproduits pourrait être utile pour la PDT s'ils sont eux même photoréactifs. L'efficacité photodynamique des produits ayant une bande d'absorption vers 640 nm est très controversée. König (1990) rapporte une très faible activité sur culture de cellules. Les mesures physiques des rendements en état triplets et

en oxygène singulet pour des solutions d'HpD enrichies de photoproduits montre que l'extinction de l'état triplet est beaucoup plus rapide et le rendement en oxygène singulet beaucoup plus faible que dans celui de la solution d'HpD témoin.

Giniunas *et al* (1990) ont montré que l'exposition à la lumière (laser argon bleu-vert) de solutions d'HpD dans du tampon phosphate induisait la formation de photoproduits (HpDPP) actifs, stables avec une nouvelle bande d'absorption vers 640 nm. Leur cinétique de formation a été déterminé à partir de la variation de l'absorption à 640 nm en fonction de la durée d'exposition. Les solutions ainsi préparées sont expérimentées sur tumeurs de souris. Deux sources de lumières sont utilisées simultanément, une lampe xénon de longueur d'onde $\lambda=610$ à 660 nm et un laser krypton de longueur d'onde $\lambda=647$ nm.

Après irradiation, l'observation de la croissance dynamique des tumeurs, de la durée de vie moyenne des animaux et les changements morphologiques des tissus tumoraux incitent l'auteur à considérer que les HpDPP sont des photosensibilisateurs plus actifs que l'HpD. L'explication physique repose sur un coefficient d'extinction de l'HpDPP à 640 nm supérieur à celui de l'HpD à 620 nm (Jonusauskas *et al* 1987). Dans l'intervalle spectral compris entre 610 et 660 nm, le nombre de photons absorbé par les HpDPP est deux fois supérieur à celui de l'HpD (Giniunas *et al* 1991).

L'existence de ces photoproduits pourrait expliciter une contradiction longtemps rencontrée dans la littérature. Moan *et al* (1984) et Byrne *et al* (1987) ont constaté que les porphyrines ayant un degré d'agrégation important avaient une meilleure activité photosensibilisatrice mais paradoxalement, leur rendement en oxygène singulet était nettement moins important que celui des espèces monomériques. L'explication serait la contribution active des photoproduits qui ont un rendement en oxygène singulet beaucoup plus important que la molécule mère. Dietel *et al* (1990) ont rapporté que ces photoproduits étaient efficaces même à des longueurs d'ondes inférieures à 640 nm. Dans ce cas, leur activité photodynamique est inférieure à celle de l'HpD mais reste néanmoins comparable à celle de l'HpD à des niveaux d'absorption plus faibles.

L'étude du photoblanchiment des porphyrines dans les systèmes biologiques doit non seulement considérer la photodégradation des molécules mais également leur phototransformation.

La diversité des facteurs physico-chimiques pouvant influencer les événements ainsi que la complexité chimique d'un mélange comme l'HpD, contribuent à la difficulté d'étude d'un tel phénomène en milieu biologique. Si le choix de l'HpD n'est pas le meilleur, il a été guidé par le fait que le photosensibilisateur était utilisé en clinique

humaine et avait bénéficié d'études plus approfondies en comparaison à d'autres molécules.

Objectifs de l'étude

OBJECTIFS DE L'ÉTUDE

La thérapie photodynamique requiert l'action combinée de la lumière et des composantes actives du photosensibilisateur. Nos travaux concernent l'évaluation *in vitro* et *in vivo* des effets biologiques de la thérapie photodynamique.

L'un des facteurs pouvant conditionner l'efficacité du traitement est le phénomène de photoblanchiment. Il se traduit par une modification du spectre d'absorption, une diminution de l'intensité de fluorescence ainsi qu'une formation de nouveaux photoproduits. Toutes ces modifications affectent les potentialités thérapeutiques et diagnostiques du photosensibilisateur.

L'hématoporphyrine dérivée (HpD) a été proposée en thérapie photodynamique (PDT) pour le diagnostic des néoplasies par détection de la fluorescence induite et pour leur traitement. Le choix de la longueur d'onde de lumière est un compromis entre les propriétés d'absorption de la lumière par l'HpD et par les tissus. La lumière bleue ($\lambda \leq 415\text{nm}$) correspond à la bande d'absorption maximale de l'HpD mais elle pénètre très peu les tissus (0,2 à 0,4 mm), elle est utilisée pour le diagnostic par fluorescence. La lumière rouge (630 nm) correspond quant à elle à l'une des faibles bandes d'absorption de l'HpD mais sa pénétration peut atteindre jusqu'à 5 mm dans les tissus biologiques, elle est pour cette raison utilisée à visée thérapeutique.

L'objectif principal de cette étude consiste à démontrer si l'illumination de l'HpD à visée de diagnostic peut induire la photodégradation du photosensibilisateur présent dans la tumeur et par conséquent altérer l'efficacité de l'étape thérapeutique successive

Cette étude sera réalisée sur deux modèles différents :

in vitro : sur cellules HT29 en monocouche, l'influence de l'association séquentielle des deux photoirradiations sera évaluée par le test de cytotoxicité au MTT. Ces mesures seront comparées à des mesures de fluorescence intracellulaire de l'HpD par cytométrie en flux et à des mesures spectrométriques (absorption et émission de fluorescence).

in vivo : sur tumeurs HT29 greffées, les résultats obtenus dans le protocole d'association séquentielle des deux lumières seront comparés à ceux obtenus dans les protocoles de photoirradiations uniques en lumière rouge ou en lumière bleue.

Différentes méthodes d'évaluation seront utilisées : l'extraction chimique de l'HpD intratumorale, l'évaluation de la décroissance de fluorescence de l'HpD intratumorale,

le dosage du MDA marqueur de la peroxydation des lipides membranaires qui interviennent dans le processus radicalaire. Les résultats obtenus par ces méthodes d'évaluation indirectes seront comparés aux résultats obtenus par la méthode d'évaluation des effets biologiques.

En raison de l'influence du microenvironnement sur la cinétique et les processus de photodégradation, dans une seconde partie de notre étude, nous nous intéresserons à la caractérisation et à l'évaluation du phénomène de photoblanchiment de l'HpD dans différents milieux biologiques et par différentes méthodes.

In vitro : sur solutions d'HpD photoirradiées à différentes fluences de lumière en présence ou en absence de sérum. Trois méthodes sont sélectionnées : la décroissance de l'absorbance au niveau de la bande de Soret, la décroissance de fluorescence induite par excitation dans la bande de Soret et une troisième méthode basée sur la diminution de la photoinactivation cellulaire. Une analyse comparative des constantes de photodégradation évaluées par ces différentes méthodes sera réalisée.

In vivo : sur tumeurs HT29 greffées sur souris après injection d'HpD et exposition à différentes fluences en lumière bleue ($\lambda < 415$ nm) ou en lumière rouge (630 nm). Sachant que la profondeur de pénétration de la lumière bleue dans les tissus est limitée, nous rechercherons si les phénomènes de photodégradation se propagent dans la tumeur en évaluant la cinétique de photodégradation à différents niveaux de l'épaisseur de la tumeur. Les constantes de photodégradation seront évaluées à partir de la diminution de la fluorescence des tumeurs et de la décroissance des quantités d'HpD extraites des tumeurs.

Nos résultats seront présentés en deux parties distinctes, la première comprendra les essais *in vitro* sur culture de cellules et sur solutions d'HpD, la seconde partie traitera de l'expérimentation animale.

Essais "in vitro"

CHAPITRE IX

ÉVALUATION DE L'EFFET DE L'ASSOCIATION SÉQUENTIELLE DE DEUX PHOTOIRRADIATIONS. CONSÉQUENCES DU PHOTOBLANCHIMENT ET DE LA FORMATION DES PHOTOPRODUITS SUR L'EFFICACITÉ DE LA PDT

1-Objectif de l'étude

L'objectif de cette étude est de reproduire sur un modèle *in vitro* un schéma clinique hypothétique où un diagnostic par détection de fluorescence précéderait un traitement photodynamique et d'en évaluer les conséquences sur l'activité thérapeutique.

La photodégradation associe la photodestruction des molécules et la formation de nouveaux produits (Moan, 1988 ; König, 1990). Ces deux phénomènes sont susceptibles d'interférer sur l'effet cytotoxique.

En explorant un large intervalle de fluences en lumière bleue, nous nous efforcerons d'approcher les deux phénomènes et d'étudier leur interactions et leurs conséquences. Plusieurs techniques sont mises en œuvre.

1-Un essai de cytotoxicité où les résultats sont interprétés après analyse d'isobologrammes selon le principe décrit par Berenbaum (1991).

2-Une analyse en cytométrie en flux de la fluorescence intracellulaire des cellules photoirradiées. L'allure des courbes de décroissance de fluorescence fournit une information sur la cinétique de photodégradation de l'HpD dans les cellules. Les intensités de fluorescence mesurées sur les échantillons photoirradiés peuvent être comparées à la valeur de fluorescence témoin et fournir une donnée quantitative du phénomène de photodégradation.

3-Des mesures spectrométriques d'absorption et d'émission de fluorescence.

2 - Matériel et méthodes

2-1- Hématoporphyrine dérivée (HpD)

Une solution injectable à 5 mg/ml d'origine australienne (Queen Elizabeth Hospital, Woodville, Australie) est utilisée. Elle est stockée en absence de lumière à une température de 0°C. Avant utilisation, les aliquots sont dilués dans du milieu de culture stérile supplémenté de 10% de sérum de veau fœtal (SVF) pour obtenir des concentrations comprises entre 5 et 100 µg/ml.

2-2- Lignée cellulaire

La lignée cellulaire utilisée est le carcinome de côlon humain HT-29, cette lignée a été isolée en 1964 par J. Fogh. Elle est classée de grade histologique II (tumeur moyennement différenciée) et présente une morphologie épithéliale (ATCC 1988).

Cette lignée se cultive en monocouche à une concentration de 5.10^4 cellules/ml dans du milieu Dulbecco's MEM (Biochrom, Berlin, FRG) enrichi de L-glutamine 200 mM (2%), d'insuline 40 UI/ml (3%), de pénicilline et streptomycine 100 U-100 µg/ml (1%) et de 10% de serum de veau fœtal (Sigma). Les cellules sont maintenues à 37°C, à 5% de CO₂ et le milieu est remplacé deux fois par semaine.

2-3- Les sources de lumière

La lumière bleue : est émise par un laser krypton (Spectra Physics 2020) délivrant la lumière à une longueur d'onde inférieure à 415 nm (deux raies principales à 407 et 413 nm). La puissance de la lumière émise est de 100 mW. La densité de lumière (irradiance) utilisée est de 0,1 mW.cm⁻² et les fluences de photoirradiation des cellules varient de 0,01 à 0,5 J.cm⁻².

La lumière rouge : est émise par un laser à colorant pompé par un laser argon. Le laser argon (Spectra Physics 2030) émet de la lumière dans un intervalle spectral compris entre 350 et 700 nm à une puissance maximale de 25 W. Le laser à colorant (Spectra Physics 375B) utilise le kiton-red dont la longueur d'onde d'émission est réglée à 630 nm. Sa puissance maximale est de 3,7 W.

La puissance utilisée en sortie de fibre du laser argon-colorant est à de 2 W, l'irradiance est maintenue constante à 1,6 mW.cm⁻². La fluence utilisée pour les essais de photoirradiation des cellules en lumière rouge est de 20 J.cm⁻².

Les photoirradiations : sont strictement définies, la lumière est transmise par une fibre optique de 600 µm de diamètre portant à son extrémité une microlentille. L'homogénéité et le diamètre du spot sont obtenus par réglage de l'écrasement de la fibre. La puissance en sortie de fibre est contrôlée régulièrement (puissance-mètre Newport 815).

Des spots lumineux de 20 cm de diamètre. sont obtenus en maintenant la fibre optique à une hauteur de 45 cm au dessus des plaques multipuits. Les fluences sont déterminées par le temps d'exposition et de la puissance lumineuse en sortie de fibre. L'homogénéité des spots est contrôlée par six mesures réparties sur la totalité du spot.

2-4 - Essais de cytotoxicité au MTT

Les essais de cytotoxicité sont réalisés avec du MTT (bromure de 4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényle tétrazolium ; Sigma, M-2128). Cette méthode est dérivée de la technique mise au point par Mosmann (1983). Le MTT est un composé jaune pâle en solution aqueuse, qui est métabolisé par les cellules vivantes et transformé en sel de formazan de coloration brune (figure IX.1).

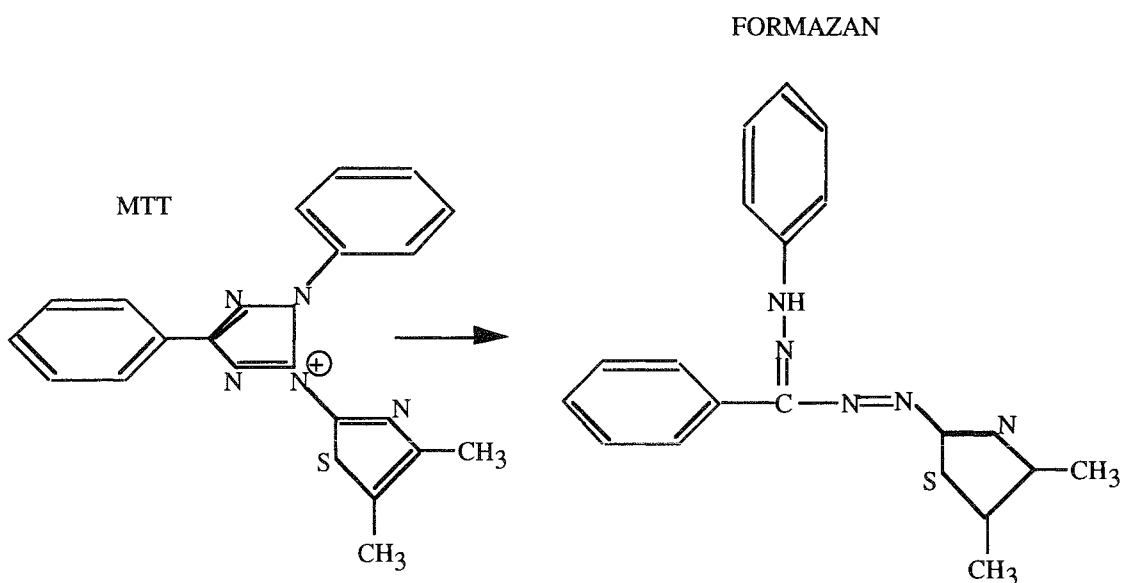


Figure IX.1 : Structure chimique du MTT et de son produit de transformation

Le principe de cet essai est basé sur la réduction mitochondriale du MTT par les succinates déshydrogénases, couplées au système des cytochromes oxydases en deux

points de la chaîne (Mosmann 1983). Ainsi, seules les cellules dont l'activité mitochondriale respiratoire est intacte sont capables de réduire métaboliquement le MTT dont le produit de transformation absorbe la lumière vers 540 nm. Cet essai a été comparé dans la littérature aux essais clonogéniques et une corrélation significative a été constatée entre les deux méthodes (Carmichael 1987, Merlin 1991).

L'évaluation de la cytotoxicité induite par traitement photodynamique est réalisée selon la méthode rapportée par J.L. Merlin (1992) (figure IX.2). Des boîtes de culture multipuits (96 puits) sont utilisées, dans chacun des puits sont ensemencées 2.10^4 cellules. Trois jours après ensemencement, le milieu est aspiré et remplacé par des solutions d'HpD (10 à 100 $\mu\text{g/ml}$). Ces dilutions sont réalisées à partir de la solution mère d'HpD à 5 mg/ml dans du milieu de culture dépourvu de rouge de phénol, indicateur de pH dont l'absorption propre de la lumière peut interférer avec les effets de la PDT (Merlin *et al*, 1991). Pour chaque concentration d'HpD seront réalisés 8 essais. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant 3 heures, puis lavées au P.B.S et replacées dans du milieu de culture complet. Les boîtes sont ensuite exposées à la lumière.

Les cellules sont d'abord exposées à différentes fluences (de 0,01 à 0,5 J.cm^{-2}) en lumière bleue délivrée par le laser krypton ($\lambda < 415\text{nm}$). Elles sont immédiatement, soumises à la lumière rouge du laser à colorant ($\lambda = 630\text{ nm}$) à une fluence de 20 J.cm^{-2} . La fluence de 20 J.cm^{-2} en lumière rouge a été sélectionnée par des essais dose-réponse (Merlin, 1991). 48 heures après la photoirradiation, chaque puits reçoit 50 μl d'une solution de MTT (5 mg/ml) dilué dans du PBS. Après 3 heures de contact nécessaire à la métabolisation du colorant, l'intégrité cellulaire est détruite par addition de 50 μl de dodécyl sulfate de sodium (SDS) à 25% et la densité optique est lue à 540 nm sur un lecteur de microplaques Titertek Multiskan MCC/340 (Flow Laboratories, Les Ulis, France).

Les résultats sont exprimés en terme de pourcentage de prolifération cellulaire par rapport à un témoin non traité et comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec la photoirradiation en lumière rouge uniquement. Des essais témoins sont réalisés afin d'évaluer la cytotoxicité de l'HpD en absence de lumière et de la lumière en absence d'HpD (lumière bleue et lumière rouge). Toutes les mesures ont été reproduites à trois reprises, chaque série comportant 8 points d'essai

Méthode de calcul de l'additivité de deux traitements

Lors d'association de deux traitements photodynamiques différents B (lumière bleue) et R (lumière rouge), induisant chacun une cytotoxicité sur les cellules en culture, l'effet de leur utilisation conjointe B+R (lumière bleue + lumière rouge) peut être estimé à partir de l'analyse des courbes iso-effet (Berenbaum 1981, Merlin 1994).

L'observation d'un effet identique E (iso-effet) est obtenu selon le traitement utilisé (B, R ou B+R) à des concentrations en HpD différentes.

L'index d'interaction (I) des deux traitements est calculé algébriquement comme étant la somme des rapports des concentrations requises pour obtenir l'iso-effet E par le traitement B+R sur la concentration susceptible de produire le même effet dans le cas des traitements B et R seuls.

$$I = (C_{B+R} / C_B) + (C_{B+R} / C_R)$$

C_B : concentration requise pour produire l'effet E après photoirradiation en lumière bleue,

C_R : concentration requise pour produire l'effet E après photoirradiation en lumière rouge,

C_{B+R} : concentration requise pour produire l'effet E dans le cas de l'association des deux lumières.

Si $I < 1$ l'effet est synergique

$I = 1$ l'effet est additif

$I > 1$ l'effet est antagoniste

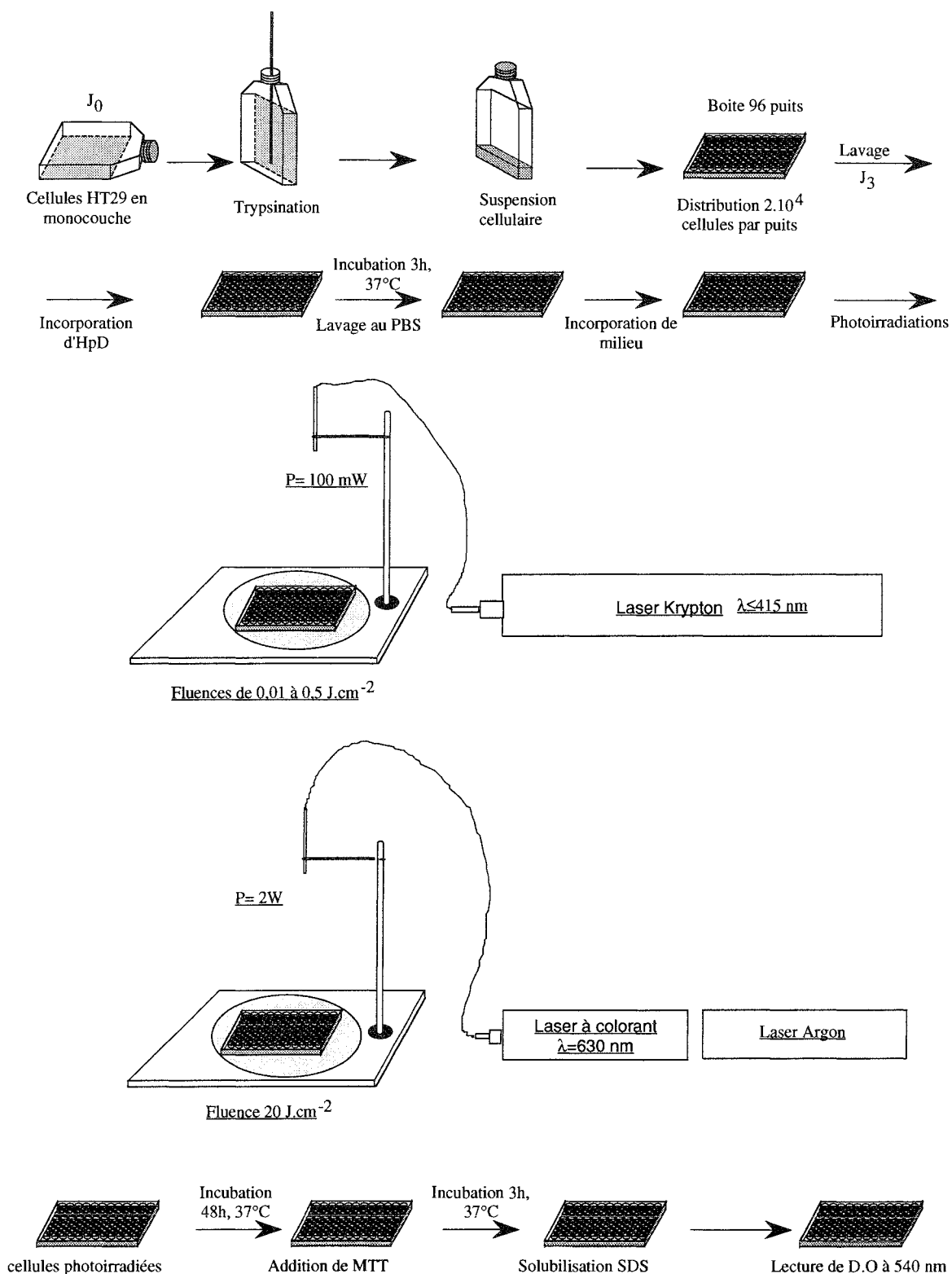


Figure IX.2 : Protocole expérimental des essais de cytotoxicité au MTT sur cellules HT29, après association séquentielle de deux photoirradiations (415 et 630 nm) en présence d'HpD.

2-5- Cytométrie en flux

Le schéma expérimental est représenté figure IX.3. Les cellules sont mises en culture pendant 3 jours à 37°C dans des boîtes 25 cm² (2.10⁶ cellules par boîte). Le milieu de culture est ensuite remplacé par une solution d'HpD (50 à 200 µg/ml). Après trois heures d'incubation, les cellules sont lavées deux fois avec du PBS, trypsinées et remises en suspension dans du milieu de culture. La suspension cellulaire est ensuite distribuée dans des boîtes de 3,5 cm de diamètre qui seront photoirradiées selon différentes modalités. Entre les photoirradiations, les cellules sont maintenues à l'obscurité. Les cellules sont ensuite exposées à la lumière bleue, les valeurs d'irradiance et de fluences utilisées sont similaires à celles utilisées pour les essais de cytotoxicité (irradiance de 0,1 mW.cm⁻², fluences comprises entre 0,01 et 0,5 J.cm⁻²) et ceci dans le but de pouvoir corréler les résultats obtenus par les deux méthodes.

L'analyse de la fluorescence intracellulaire est réalisée sur un cytomètre en flux Orthocyte (Ortho Diagnostic Systems) équipé d'une lampe à Xenon. La longueur d'onde d'excitation à 488 nm est sélectionnée en intercalant sur le trajet optique un bloc filtre (miroir dichroïque + filtre passe bande). L'émission est détectée au-delà de 580 nm (filtre passe haut). Un nombre minimal de 10 000 cellules est analysé pour chaque essai. Les cellules vivantes sont identifiées et sélectionnées selon des critères morphologiques définis selon la double diffusion de lumière (FALS, Forward Angle Light Scattering et LALS, Large Angle Light Scattering). La fluorescence rouge de l'HpD intracellulaire est ensuite analysée. Le signal de fluorescence est amplifié selon un mode logarithmique et les valeurs médianes obtenues sur les histogrammes de fluorescence de la population cellulaire sont ensuite converties en valeurs linéaires d'intensité de fluorescence en utilisant la formule suivante :

$$F = 10^{(M/N \times \Delta C)}$$

M= représente le nombre de modules de l'amplificateur (=3 modules)

N= nombre des canaux de détection (=256)

ΔC= la différence du nombre du canal de fluorescence médiane rouge entre le témoin non irradié et les cellules irradiées.

La photodégradation de l'HpD est exprimée par une diminution de l'intensité de fluorescence intracellulaire par comparaison à des échantillons identiques non photoirradiés. Tous les essais réalisés ont été reproduits au minimum trois fois.

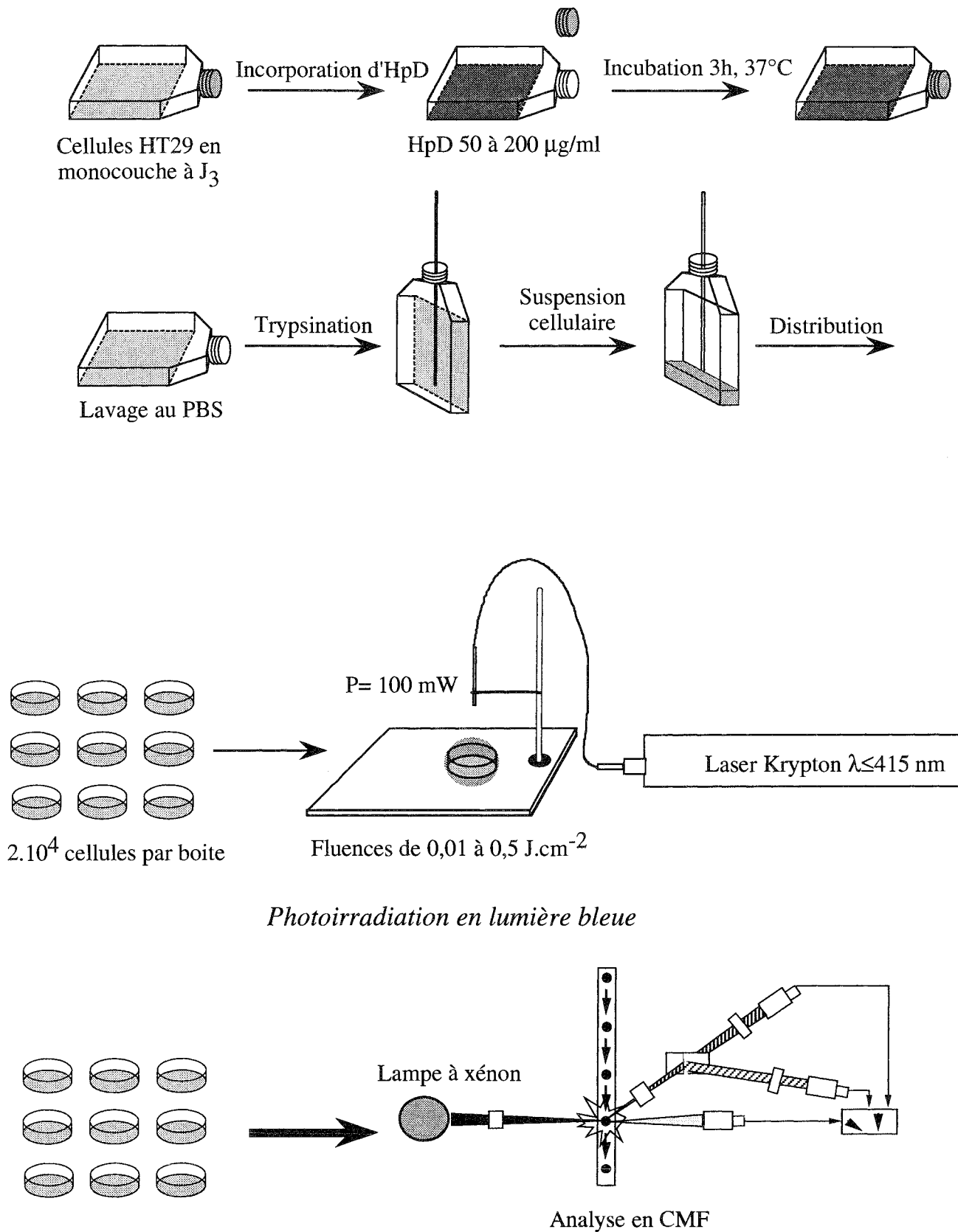
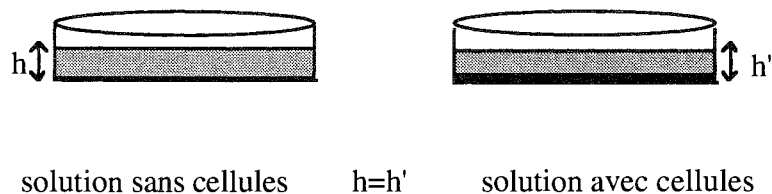


Figure IX.3 : Protocole d'évaluation par cytométrie en flux de la fluorescence intracellulaire de l'HpD après photoirradiation des cellules HT29 en lumière bleue.

2-6-Mesures spectrométriques

2-6-1- Photoirradiation des solutions

Afin de simuler l'environnement biologique dans lequel se trouvent les cellules, une solution d'HpD (5 $\mu\text{g/ml}$) est préparée dans du PBS (pH=7,4) supplémenté de 10 % de sérum de veau fœtal, ensuite photoirradiées strictement dans les mêmes conditions que lors des essais cellulaires. Le volume de solution photoirradié est de 2 ml, la hauteur de la solution dans la boîte correspond strictement à celle séparant le tapis cellulaire de la surface du milieu de culture



La source de lumière utilisée est le laser krypton ($\lambda \leq 415 \text{ nm}$). La puissance de la lumière émise est de 100 mW. La densité de lumière (irradiance) utilisée est de 0,1 mW.cm⁻², les fluences varient de 0,01 à 2 J.cm⁻². Le protocole expérimental de photoirradiation des solutions est schématisé figure IX.4.

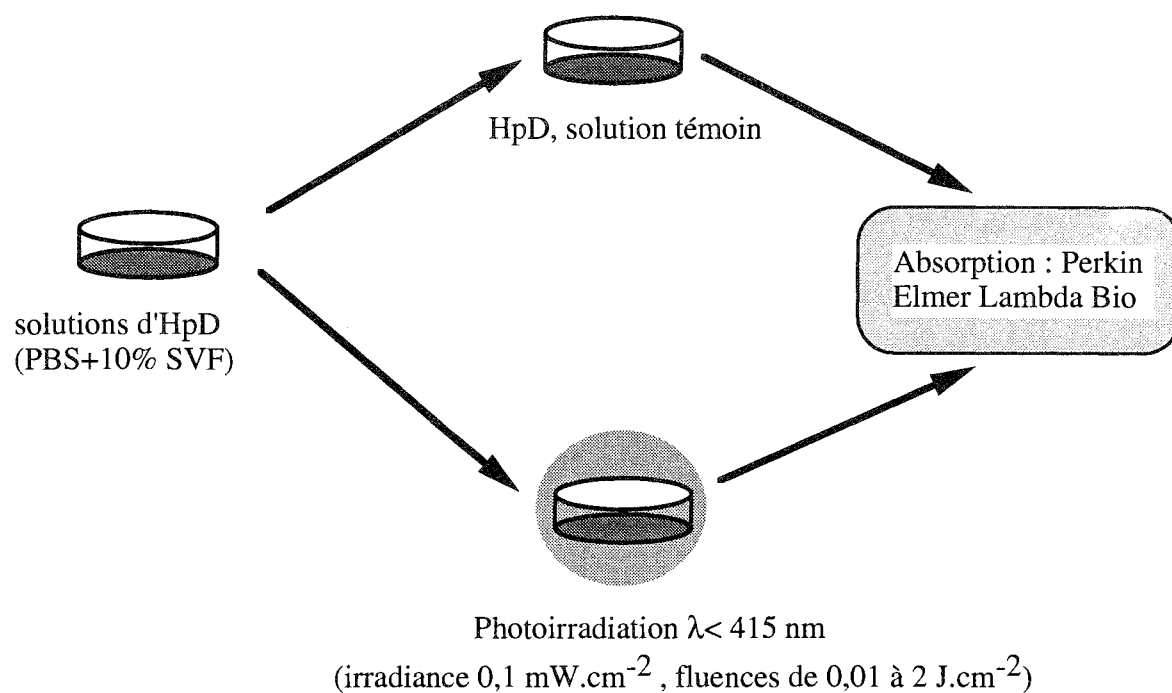
2-6-2-Spectrofluorimétrie

Les spectres d'émission de fluorescence sont mesurés à l'aide d'un spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS 50B. La longueur d'onde d'excitation des solutions correspond à la bande d'absorption maximale de l'HpD ($\lambda_{\text{exc}}=405 \text{ nm}$) et les spectres sont enregistrés de 540 à 700 nm et traités par un logiciel (FL Data Manager) qui permet de gérer les opérations d'intégration, de soustraction ainsi que diverses autres fonctions.

2-6-3-Spectrophotométrie

Les spectres d'absorption sont réalisés à l'aide d'un spectrophotomètre Perkin-Elmer (UV-visible Lambda-Bio) géré par le logiciel PECSS. Les spectres sont enregistrés de 350 à 700 nm. Les spectres d'absorption différentielle sont obtenus en prenant comme ligne de base l'absorption d'une solution équimolaire d'HpD sans photoirradiation.

Mesures spectrophotométriques



Mesures spectrofluorimétriques

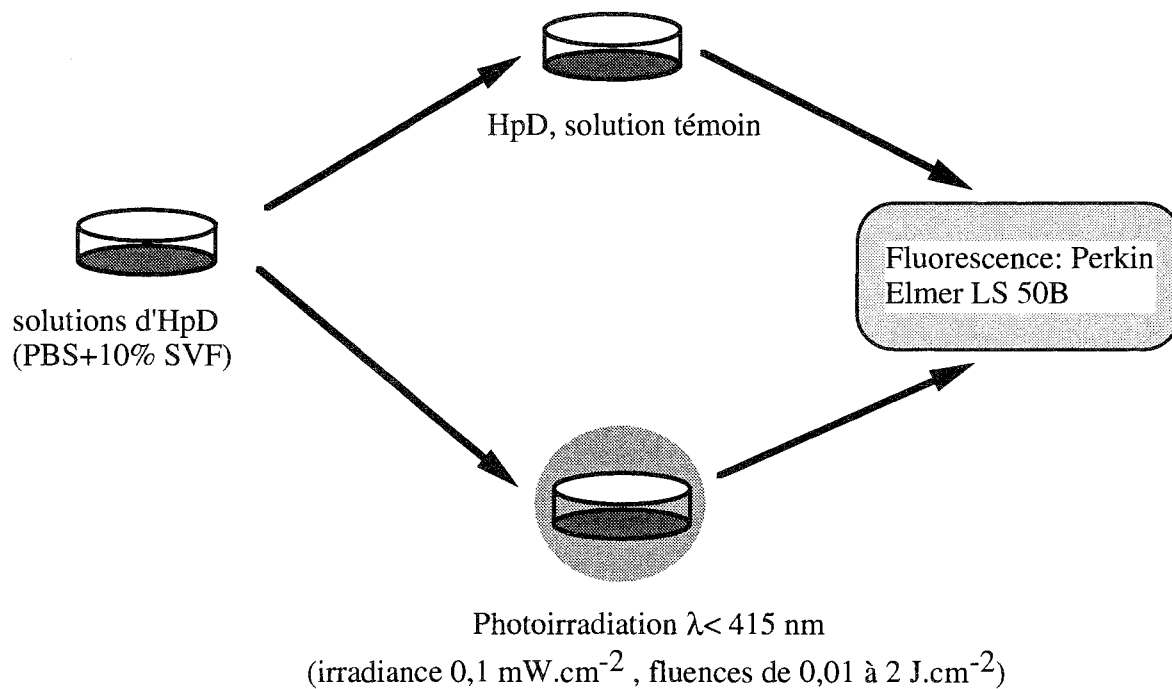


Figure IX.4 : Protocole de photoirradiation des solutions d'HpD ($5\mu\text{g/ml}$, $\text{pH } 7,4$) dans du PBS supplémenté de 10% de SVF.

3-Résultats et discussion

3-1- Essais de cytotoxicité

3-1-1- Essais dose-réponse en lumière bleue

Avant de réaliser les essais de photoirradiations séquentielles (à 415 et à 630 nm), il est indispensable d'effectuer des essais dose-réponse à la lumière bleue afin de déterminer les niveaux de cytotoxicité générés par les fluences utilisées. Une série de doses de lumières bleue (fluences : 0,01 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,25 et 0,5 J.cm⁻²) a été associée à différentes concentrations d'HpD (10, 30, 50, 70, 90 et 110 µg/ml). Les courbes de cytotoxicité obtenues sont représentées figure IX.5.

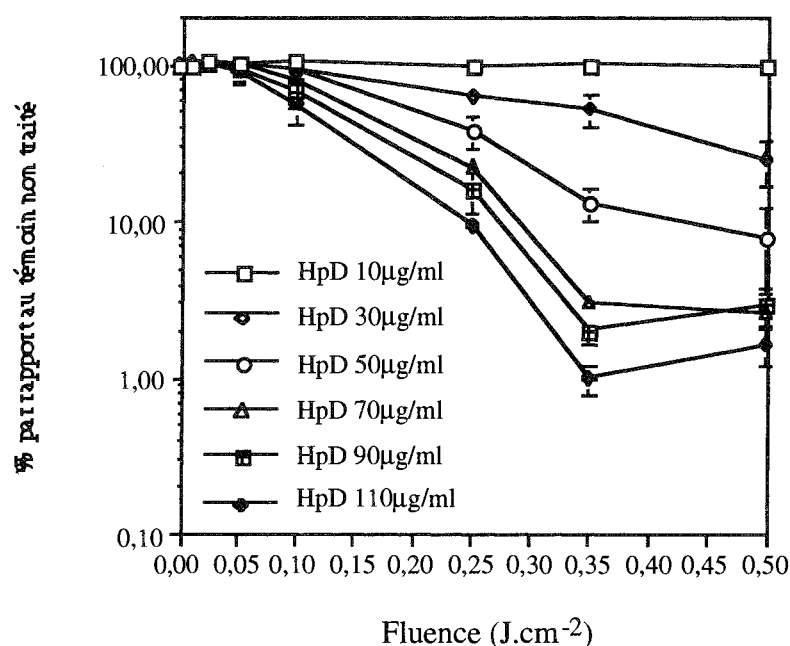


Figure IX.5 : Courbes dose-réponse de cellules HT-29, ayant incubé pendant 3 heures dans des solutions d'HpD supplémentées de 10% de SVF, puis exposées à différentes fluences de lumière bleue.

Aucun effet cytotoxique significatif n'est observé pour les fluences inférieures à 0,05 J.cm⁻² en présence d'HpD même aux concentrations les plus élevées. Les fluences

provoquant plus de 50 % de cytotoxicité sont par ailleurs comprises entre 0,1 et 0,5 J/cm².

Pour illustrer le niveau de cytotoxicité atteint aux différentes fluences, les IC₅₀ (concentrations inhibant 50 % de la croissance cellulaire) ont été calculées (figure IX.6).

Nous observons que la relation qui lie la IC₅₀ et les fluences, évolue selon une cinétique exponentielle avec un plateau qui suggère un phénomène de saturation.

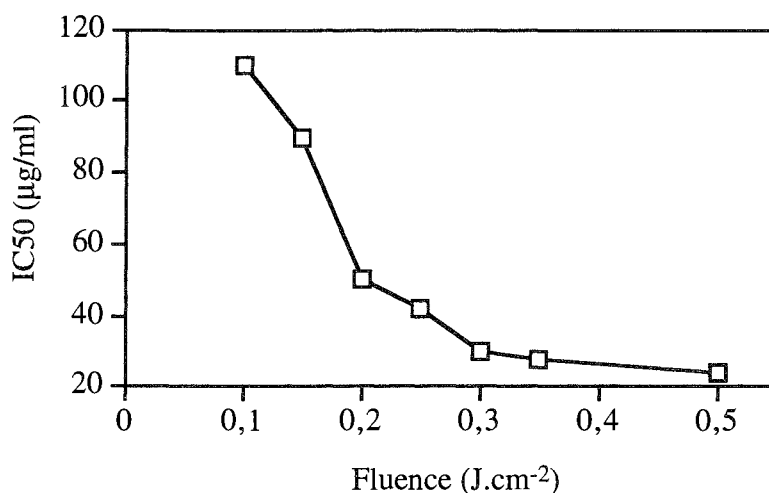


Figure IX.6 : Concentrations d'HpD requises pour induire 50% d'inhibition de la croissance cellulaire (IC₅₀) à une fluence donnée en lumière bleue. Les données correspondent à la moyenne de 3 essais réalisés en 8 exemplaires (l'erreur standard sur la moyenne est dans tous les cas inférieure à 5%).

3-1-2- Photoirradiations séquentielles (415 et 630 nm)

Ces essais ont été réalisés dans l'objectif de reproduire sur un modèle *in vitro* le schéma hypothétique d'un photodiagnostic précédant un traitement photodynamique et d'évaluer les conséquences de cette association séquentielle sur l'efficacité du traitement photodynamique. Une série de doses de lumière bleue (fluences : 0,01 ; 0,025 ; 0,05 ; 0,1 ; 0,25 et 0,5 J.cm⁻²) a été associée à une fluence fixée à 20 J.cm⁻² en lumière rouge en présence de différentes concentrations en HpD comprises entre 5 et 100 µg/ml. Au sein de cet intervalle de concentrations elle représente la dose de lumière générant un effet photodynamique optimal. Des courbes de survie en fonction de la concentration

sont réalisées pour ces essais de photoirradiations séquentielles et superposées sur un même graphique aux essais à la lumière rouge seule et à la lumière bleue seule.

Nous avons choisi de considérer 3 fluences de pré-irradiation différant par leur pouvoir cytotoxique, $0,01 \text{ J.cm}^{-2}$ est une fluence non-cytotoxique, $0,25 \text{ J.cm}^{-2}$ est moyennement cytotoxique ($\text{IC}_{50}=42 \mu\text{g/ml}$) et $0,5 \text{ J.cm}^{-2}$ est très cytotoxique ($\text{IC}_{50}=24 \mu\text{g/ml}$).

3-1-2-1-Photoirradiations séquentielles comportant des fluences en lumière bleue ne provoquant aucune cytotoxicité

Pour illustrer l'effet de l'association d'une fluence en lumière bleue ne provoquant aucun effet cytotoxique à une fluence en lumière rouge induisant une efficacité photodynamique, nous avons représenté la courbe de survie obtenue en associant $0,01 \text{ J.cm}^{-2}$ en lumière bleue à 20 J.cm^{-2} en lumière rouge en présence d'HpD.

Sur un même graphique, cette courbe est superposée aux courbes de cytotoxicité obtenues à différentes concentrations en HpD pour les essais en lumière rouge seule et lumière bleue seule (figure IX.7).

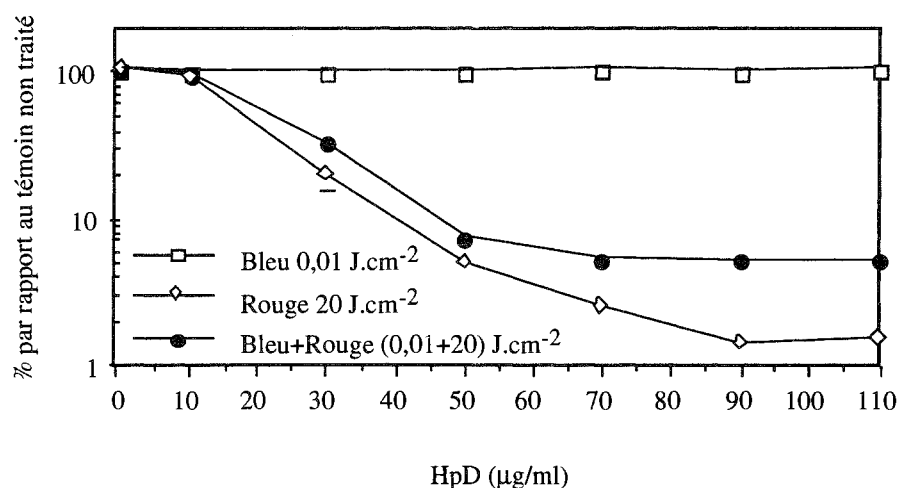


Figure IX.7 : Courbes de cytotoxicité en fonction de la concentration en HpD. Photoirradiation en lumière bleue ($0,01 \text{ J.cm}^{-2}$), en lumière rouge (20 J.cm^{-2}) et en association séquentielle des deux lumières (Bleue+Rouge). Chaque point représente la moyenne de 3 essais réalisés en 8 exemplaires (l'erreur standard calculée sur la moyenne est inférieure à 5%).

Aucune cytotoxicité n'est apparente à $0,01 \text{ J.cm}^{-2}$ ce qui permet d'extrapoler directement sur les courbes l'effet d'une photoirradiation préalable en lumière bleue. En

effet, nous observons que la courbe d'association se distingue de la courbe témoin de cytotoxicité en lumière rouge et témoigne d'une importante diminution de l'activité photodynamique. Pour illustrer cet effet, nous avons calculé les concentrations requises pour induire le même effet cytotoxique dans chacun des deux cas (tableau XI.1). Nous observons que pour obtenir des niveaux de cytotoxicité équivalents (iso-effet) les concentrations sont supérieures dans le cas de l'association des deux lumières.

Tableau IX.1 : Concentrations d'HpD requises pour produire le même effet (10, 50 et 90% d'inhibition de la croissance cellulaire) en lumière rouge (20 J.cm⁻²) et en association la lumière rouge à des fluences ne provoquant pas de cytotoxicité en lumière bleue (0,01, 0,02, 0,03 et 0,05 J.cm⁻²). Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais réalisés en 8 exemplaires (l'erreur standard calculée sur la moyenne est inférieure à 5%).

% d'inhibition de croissance	Concentrations d'HpD requises pour un isoeffet (µg/ml)				
	Lumière rouge (J.cm ⁻²)	Association des deux lumières			
	20	0,01+20	0,02+20	0,03+20	0,05+20
10	9±0,5	11±0,5	30±1,5	23±1,2	20±1,2
50	19±1	26±1,5	55±3	40±2	32±1,5
90	43±2	61±3	non déterminé	60±3	38±2

Pour un % d'inhibition de croissance donné, la concentration d'HpD pour un iso-effet passe par un maximum pour la fluence de préirradiation de 0,02 J.cm⁻².

À partir des concentrations représentées ci-dessus (tableau XI.1), sera calculé l'indice d'interaction des deux traitements. L'absence de cytotoxicité du premier traitement (lumière bleue) simplifie la formule algébrique de I et la perte d'activité peut être évaluée directement par calcul du rapport des concentrations requises pour produire un iso-effet donné pour chaque modalité de traitement.

$$I = (C_{B+R} / C_R)$$

Les concentrations d'HpD représentant trois niveaux d'activité photodynamique (10, 50 et 90 % d'inhibition de la croissance cellulaire) sont calculées pour chaque modalité de traitement et ont été considérées pour calculer les indices d'interactions. Quel que soit

l'iso-effet considéré ou la fluence de préirradiation en lumière bleue, les valeurs de I obtenues sont supérieures à 1, ce qui démontre une altération de l'efficacité photodynamique par rapport au témoin photoirradié en lumière rouge seule (tableau XI.2).

Tableau IX.2 : Indices d'interaction obtenus pour trois iso-effets (10, 50 et 90%) par association de la lumière bleue à des fluences ne provoquant aucune cytotoxicité (0,01, 0,02, 0,03, et 0,05 J.cm⁻²) à une fluence constante en lumière rouge (20 J.cm⁻²).

Fluences en lumière bleue (J.cm ⁻²)	<u>Indice d'interaction des deux lumières</u> <u>% d'inhibition de la croissance cellulaire</u>		
	10	50	90
0,01	1,2	1,4	1,4
0,02	3,5	2,9	non déterminé
0,03	2,5	2,1	1,4
0,05	2,2	1,7	1,2

3-1-2-2- Photoirradiations séquentielles comportant des fluences en lumière bleue générant un effet cytotoxique

Nous avons fait précéder la photoirradiation en lumière rouge à une fluence de 20 J.cm⁻² de celle avec différentes fluences générant un effet cytotoxique en lumière bleue (0,1 ; 0,25 ; 0,35 et 0,5 J.cm⁻²). Nous ne présentons ici que les courbes de cytotoxicité associant 0,25 et 0,5 J.cm⁻² en lumière bleue à 20 J.cm⁻² en lumière rouge (figures IX.8 et IX.9). Les courbes de cytotoxicité obtenues avec la lumière rouge seule se superposent à celles obtenues dans l'essai des photoirradiations séquentielles et aucune différence entre les deux courbes n'est observée.

Compte tenu de la cytotoxicité de la première photoirradiation en lumière bleue, aucune extrapolation graphique directe de l'effet associatif n'est possible. La nature de l'interaction est déterminée par calcul de l'indice d'interaction I à partir des concentrations requises dans chacun des essais pour induire le même iso-effet. Nous avons calculé d'après les courbes de cytotoxicité, les concentrations en HpD requises pour induire 10%, 50%, et 90% d'inhibition de la croissance cellulaire pour chaque modalité de traitement (tableau IX.3).

À l'exception de l'essai associatif avec $0,35 \text{ J.cm}^{-2}$ en lumière bleue qui manifeste une interaction nulle pour l'iso-effet 50 %, toutes les valeurs de I obtenues sont supérieures à 1 révélant ainsi une interaction négative.

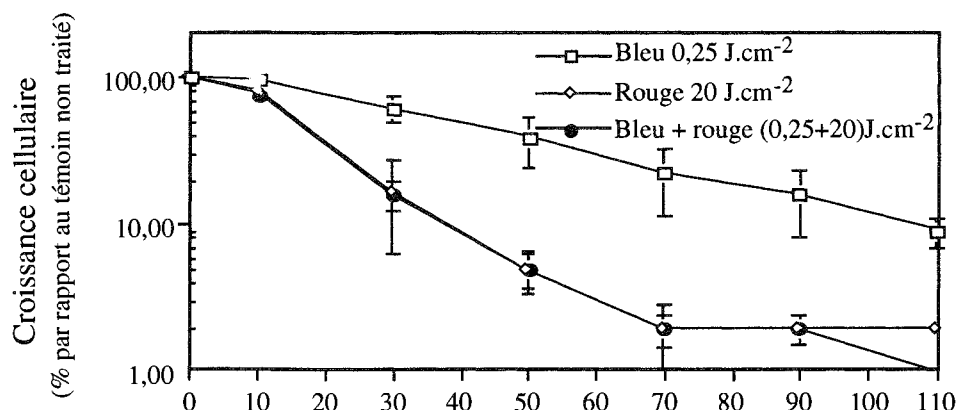


Figure IX.8 : Courbes de cytototoxicité obtenues par traitement avec la lumière bleue ($0,25 \text{ J.cm}^{-2}$), la lumière rouge (20 J.cm^{-2}) et l'association séquentielle des deux lumières (Bleue+Rouge) en présence d'HpD. Chaque point représente la moyenne de 3 essais réalisés en 8 exemplaires (l'erreur standard calculée sur la moyenne est dans tous les cas inférieure à 5%).

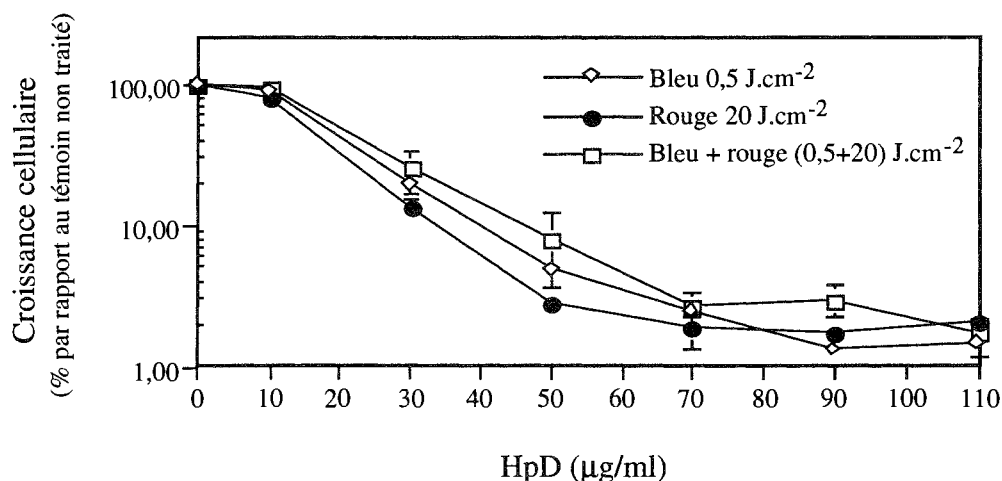


Figure IX.9 : Courbes de cytototoxicité obtenues par traitement avec la lumière bleue ($0,5 \text{ J.cm}^{-2}$), la lumière rouge (20 J.cm^{-2}) et l'association séquentielle des deux lumières (Bleue+Rouge) en présence d'HpD. Chaque point représente la moyenne de 3 essais réalisés en 8 exemplaires (l'erreur standard calculée sur la moyenne est dans tous les cas inférieure à 5%).

Tableau IX.3 : Concentration d'HpD requises pour produire les iso-effets (10, 50 et 90%) en lumière rouge (20 J.cm⁻²) et par association séquentielle de la lumière bleue (0,1, 0,25, 0,35 et 0,5 J.cm⁻²) à la lumière rouge. Les valeurs représentées sont calculées à partir des courbes dose-réponse obtenues en présence d'HpD. Chaque point représente la moyenne de 3 essais réalisés en 8 exemplaires (l'erreur standard calculée sur la moyenne est dans tous les cas inférieure à 5%).

% d'inhibition de croissance	Concentrations d'HpD requises pour un isoeffet								
	Lumière bleue (J.cm ⁻²)				Lumière rouge (J.cm ⁻²)	Association des deux lumières			
	0,1	0,25	0,35	0,5	20	0,1+20	0,25+20	0,35+20	0,5+20
10	45±2,5	17±0,9	10±0,5	12±0,6	9±0,5	20±1,5	6±0,5	5±0,5	9±0,6
50	70±4,2	42±2	30±2	24±1	19±1	50±1,5	16±2	12±2	19±2
90	non déterminé	105±5	42±3	51±2,5	43±2	60±3,5	40±2	37±2	39±2

Nous observons que la concentration d'HpD requise pour atteindre un iso-effet donné est plus importante à 0,25 J.cm⁻² qu'à 0,35 J.cm⁻² particulièrement pour l'iso-effet 50%.

Tableau IX.4 : Indices d'interaction obtenus pour trois iso-effets (10, 50 et 90%) par association séquentielle de la lumière bleue à des fluences provoquant un effet cytotoxique (0,1, 0,25, 0,35 et 0,5 J.cm⁻²) à une fluence constante en lumière rouge (20 J.cm⁻²).

Fluences en lumière bleue (J.cm ⁻²)	Indice d'interaction		
	% d'inhibition de la croissance cellulaire		
	10	50	90
0,1	2,5	3,1	1,4
0,25	1,1	1,25	1,3
0,35	1,1	1	1,3
0,5	1,75	1,8	1,7

Pour illustrer l'effet interactif des deux lumières sur toute la gamme de fluences utilisées en lumière bleue, les valeurs de I ont été reportées sur un graphe (figure IX.10).

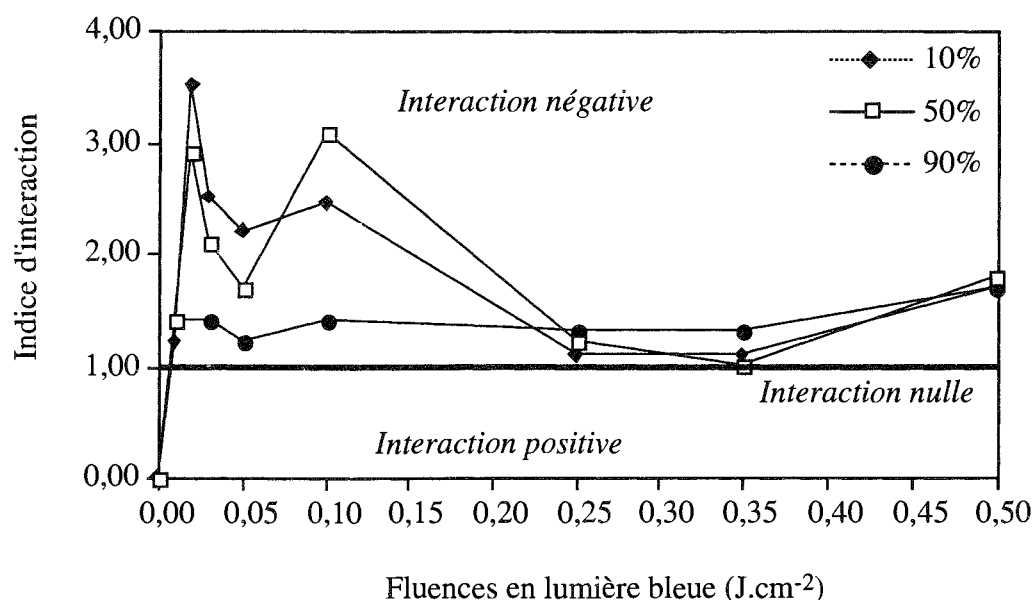


Figure IX.10 : Variation de l'indice d'interaction I en fonction des fluences de photoirradiation en lumière bleue associée à une fluence de $20 J.cm^{-2}$ en lumière rouge, en présence d'HpD.

Globalement, tous les points se situent au-dessus de 1, témoignant d'un effet négatif. Cependant, selon l'intervalle de fluences considéré, la valeur de I est plus ou moins importante. En effet entre 0 et $0,03 J.cm^{-2}$, la valeur de I est largement supérieure à 1 (jusqu'à 3,5 pour un iso-effet de 10% d'inhibition de la croissance cellulaire) et aurait tendance à augmenter en fonction des fluences. Au-delà de $0,03 J.cm^{-2}$ et jusqu'à $0,05 J.cm^{-2}$, l'indice d'interaction I est toujours supérieur à 1 mais sa valeur décroît en fonction des fluences. Entre $0,05$ et $0,1 J.cm^{-2}$, I augmente à nouveau pour ensuite décroître progressivement entre $0,1$ et $0,35 J.cm^{-2}$. Au-delà de $0,35 J.cm^{-2}$ l'effet interactif négatif est de nouveau plus prononcé avec des valeurs de I d'environ 1,7.

Comment interpréter cette évolution de l'effet interactif?

Si seul le phénomène de photodégradation est envisagé, l'indice I devrait non seulement être supérieur à 1 mais de plus évoluer selon un profil logarithmique inverse à la cinétique exponentielle du photoblanchiment. Par conséquent, l'effet que nous

observons ne peut être exclusivement le résultat d'une photodégradation stricte des molécules d'HpD.

Quels sont alors les différents facteurs qui altèrent l'efficacité photodynamique de la seconde exposition en lumière rouge?

Selon l'intervalle de fluences considéré, différentes hypothèses peuvent être émises.

Nous nous intéresserons tout d'abord aux fluences comprise entre 0,01 et 0,03 J.cm⁻² qui ne génèrent aucune cytotoxicité en présence d'HpD mais pour lesquelles nous observons néanmoins un effet négatif très prononcé avec un maximum obtenu à 0,02 J.cm⁻² (jusqu'à 3,5 pour un pourcentage d'inhibition de la croissance cellulaire de 10%).

L'absence de cytotoxicité dénote un effet photobiologique très faible sinon inexistant. L'absence de cytotoxicité à ces fluences n'exclut pas la photodégradation de l'HpD. Le seuil photochimique est plus faible que le seuil photobiologique et les effets cellulaires réels sont probablement insuffisants pour induire une perturbation détectable par le test au MTT.

Sachant que la photodégradation est engendrée par des réactions de même type que ceux impliqués dans les processus de cytotoxicité (réactions photochimiques de type I et de type II), Il semble donc difficile dans ces conditions d'absence de cytotoxicité d'admettre un effet de photoblanchiment important et d'attribuer l'interaction négative observée dans cet intervalle de fluences à une simple photodégradation de l'HpD.

Par ailleurs l'exposition des cellules à des doses de lumière ne provoquant pas de cytotoxicité en présence d'HpD, peut engendrer un mouvement photoinduit des porphyrines de leur site initial de liaison vers d'autres sites cellulaires (Moan, 1986 ; Moan *et al*, 1988 ; Rück *et al*, 1990). Ceci aurait pour conséquences l'altération de l'efficacité photodynamique en raison du changement des sites d'action.

De plus cette translocation photoinduite est accompagnée d'une modification du microenvironnement de l'HpD ce qui conduit à des transformations chimiques telles la désagrégation et/ou la formation de nouveaux photoproduits ne possédant aucune activité photodynamique qui peuvent être également à l'origine de l'effet négatif observé dans cet intervalle de fluences.

Au-delà de 0,03 J.cm⁻² et jusqu'à 0,05 J.cm⁻² l'indice d'interaction I est toujours supérieur à 1 mais sa valeur décroît légèrement jusqu'à 0,05 J.cm⁻² pour augmenter à nouveau à partir de 0,1 J.cm⁻². Sachant qu'à partir de cette fluence, un pouvoir cytotoxique apparaît, la diminution de l'activité photodynamique illustrée par

l'augmentation de l'indice I à cette fluence peut être interprétée comme la conséquence de la photodégradation de l'HpD.

En revanche pour les fluences comprises entre 0,1 et 0,35 J.cm⁻² la diminution très importante de la valeur de I suggère la dégradation de la molécule mère. Mais on peut supposer une formation concomitante de nouveaux produits avec probablement une activité photosensibilisatrice susceptible de compenser en partie l'effet négatif engendré par le photoblanchiment.

Au-delà de cet intervalle de fluences, la valeur de I devient plus importante suggérant à nouveau la prédominance du processus de photodégradation qui doit alors englober les molécules mères et les photoproduits.

Néanmoins, tous ces événements photochimiques ou biologiques évoqués pour interpréter l'évolution de l'effet interactif en fonction de la fluence n'en demeurent pas moins des hypothèses qui restent à vérifier.

Dans une première étape, nous essayerons de démontrer le phénomène de photodégradation par analyse de fluorescence, la diminution de l'intensité de fluorescence reflétant le photoblanchiment des porphyrines.

Pour cela, nous avons utilisé la cytométrie en flux permettant d'analyser l'évolution de la fluorescence intracellulaire après exposition aux différentes fluences en lumière bleue.

En parallèle, des mesures spectrofluorimétriques ont été réalisées sur des solutions d'HpD supplémentées de 10% de sérum de veau fœtal et photoirradiées dans les mêmes conditions que les cellules dans le but de confirmer les données obtenues au niveau intracellulaire par la CMF mais également de rechercher l'apparition éventuelle de nouveaux pics d'émission relatifs aux photoproduits.

3-2- Etude par CMF de l'évolution de la fluorescence de l'HpD intracellulaire après photoirradiation

Pour réaliser cette étude, nous avons incubé les cellules HT29 pendant 3 heures en présence de différentes concentrations d'HpD. Après lavage, les cellules sont exposées à la lumière bleue à différentes fluences (0,01 à 0,5 J.cm⁻²). Durant tout le protocole expérimental, les cellules sont maintenues dans l'obscurité. La fluorescence intracellulaire de l'HpD est mesurée par cytométrie en flux immédiatement après photoirradiation.

Les intensités de fluorescence obtenues (unités arbitraires) sont représentées en fonction des doses de photoirradiation et des concentrations en HpD (figure IX.11). L'évolution de l'intensité de fluorescence intracellulaire est caractérisée par une augmentation de la fluorescence initiale pour des fluences inférieures à 0,03 J/cm², suivie d'une décroissance exponentielle d'allure bimodale.

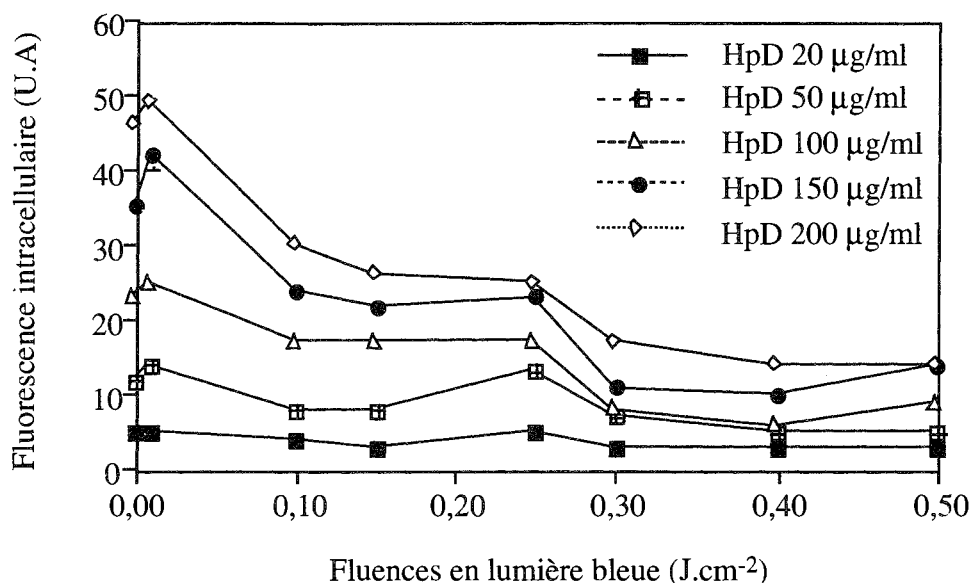


Figure IX.11: Evolution de la fluorescence de l'HpD intracellulaire sur cellules HT29 photoirradiées et analysées par CMF. Chaque point représente la moyenne obtenue sur au moins trois essais (l'erreur standard calculée sur la moyenne est inférieure 5%)

Le phénomène initial d'augmentation de fluorescence est statistiquement significatif ($p < 0,04$, test Student apparié).

Comment expliquer cette augmentation de la fluorescence initiale ?

Dans le milieu intracellulaire, les interactions liant les événements biologiques, chimiques et photochimiques compliquent l'interprétation des effets de la lumière. La compétition entre l'augmentation de fluorescence et le photoblanchiment dans le milieu intracellulaire a été rapporté dans la littérature.

Elle est observée après de très courtes expositions à la lumière et a été attribuée à un déplacement intracellulaire photoinduit des porphyrines dont le macrocycle tétrapyrrolique resterait intact mais dont le changement du microenvironnement chimique favoriserait certaines réactions de transformations chimiques comme la

désagrégation ou la formation de nouveaux photoproduits qui induiraient des modifications spectrales (Moan, 1986 ; Moan, 1988 ; Moan *et al*, 1988 ; Rück *et al*, 1990).

Pour expliquer la baisse d'efficacité du traitement observée aux fluences inférieures à $0,03 \text{ J.cm}^{-2}$, nous avons déjà évoqué les hypothèses de translocation cellulaire de l'HpD avec une modification des sites d'action de la PDT, ainsi que les modifications chimiques photoinduites des porphyrines telle la désagrégation.

L'augmentation de fluorescence observée à ces fluences serait un élément supplémentaire en faveur de la désagrégation (monomérisation) des porphyrines dans le milieu intracellulaire qui augmenterait la proportion du phénomène de conversion intersystème et l'effet photochimique. Par conséquent l'effet négatif observé lors des associations (lumière bleu, lumière rouge) pourrait être attribué à un processus de photodégradation.

En revanche, la seconde partie de la courbe décrit une décroissance exponentielle de la fluorescence qui caractérise le phénomène de photoblanchiment. Cette décroissance en deux temps suggère la coexistence de plusieurs cinétiques plus ou moins rapides. L'HpD étant un mélange de plusieurs espèces chimiques, son photoblanchiment implique plusieurs processus (Moan 1987, Moan 1988, Moan 1991). En effet, il a été démontré que dans un même environnement biologique, les agrégats de l'HpD réagissent selon des processus de type I alors que dans le même système les monomères et les dimères réagissent selon des réactions de type II (Grossweiner, 1982).

La cinétique bi-exponentielle peut également être attribuée à la différence d'accumulation du photosensibilisateur à l'intérieur de la cellule et l'influence du microenvironnement chimique sur la cinétique de photoblanchiment des porphyrines (Rück *et al* 1990). En effet, la localisation de l'HpD au niveau de différents sites intracellulaires dépend de la durée d'incubation et du degré d'hydrophobicité du photosensibilisateur. Dans nos conditions expérimentales, à savoir une incubation de 3 heures des cellules avec l'HpD, la concentration du produit se fait au niveau de la membrane nucléaire, au niveau des zones cytoplasmiques adjacentes et au niveau de la membrane plasmique (Shneckenburger 1988). Si ces différents sites représentant trois micro-environnements réellement différents, la cinétique de photoblanchiment et l'extinction de la fluorescence pourraient être aussi différentes.

La différence de cinétique de photodégradation peut être également liée au photoblanchiment spécifique des porphyrines liées aux protéines. La liaison des porphyrines aux protéines accélérerait la photodégradation des porphyrines ainsi que

celles des protéines qui y sont liées. La destruction des protéines membranaires modifie la composition chimique du micro-environnement cellulaire qui devient purement lipidique et ralentit la photodégradation des porphyrines (Moan, 1988).

Pour démontrer les cinétiques exponentielles sur chaque partie de la courbe de décroissance, les constantes de photodégradation ont été calculées. Exprimées en $\text{cm}^2 \cdot \text{J}^{-1}$, les constantes k correspondent à l'inverse de la fluence induisant 37% de baisse de fluorescence, k_1 est calculé sur la partie initiale mono-exponentielle de la première partie de la courbe (fluences comprises entre 0,03 et 0,15 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$) et k_2 sur la partie mono-exponentielle initiale de la seconde partie de la courbe (fluences comprises entre 0,25 et 0,4 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$). Les valeurs des constantes k_1 démontrent une cinétique d'environ deux fois plus rapide sur la première partie de la courbe (tableau IX.5).

Au vu de ces résultats, il est donc possible d'attribuer une part de l'effet négatif observé dans les essais de photoirradiations séquentielles à la photodégradation des molécules d'HpD induite par la première photoirradiation en lumière bleue.

Il faut également noter qu'après la première baisse brutale de la fluorescence initiale à 0,03 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$, une stabilisation de la fluorescence est observée jusqu'à 0,25 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ et le même profil est observé sur la seconde partie de la courbe où une diminution nette apparaît à 0,25 $\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ suivie également d'un plateau de valeurs constantes. Ces phases de plateaux sont importantes à souligner car elles témoignent peut être de l'équilibre entre deux phénomènes, la photodégradation et la formation de nouveaux photoproduits fluorescents dont la fluorescence intrinsèque se superposerait à celle des molécules d'origine. Les valeurs de fluorescence enregistrées par cytométrie en flux, sont détectées au-delà de 600 nm par un filtre passe haut et la fluorescence des produits nouvellement formés pourrait ainsi contribuer à augmenter l'intensité enregistrée et modifier la cinétique de décroissance de fluorescence.

L'existence de ces photoproduits a été rapportée par Moan (1988) qui a observé l'apparition d'un épaulement vers 660 nm sur les spectres d'émission de fluorescence du Pf II dans les cellules photoirradiées. Il a par ailleurs observé un épaulement similaire entre 645 et 650 nm sur des solutions de Pf II irradiées à des fluences de lumière élevées (Moan, 1986).

Si l'hypothèse de la dualité représentée par la photodégradation et la formation de nouveaux photoproduits dans le milieu intracellulaire est vraie, elle pourrait expliquer la variation du niveau d'interactivité négative obtenue en fonction des fluences de préirradiation en lumière bleue.

Afin de vérifier la photodégradation et la formation des photoproduits de l'HpD en milieu intracellulaire, nous avons simulé un environnement biologique sur les solutions d'HpD, que nous avons traité dans les mêmes conditions que les cellules et analysé par des méthodes spectrométriques.

Tableau IX.5 : Constantes de photoblanchiment calculées sur les deux parties de la courbe de décroissance de fluorescence de l'HpD sur cellules HT29 photoirradiées et analysées en CMF.

HpD $\mu\text{g/ml}$	Constantes de photodégradation ($\text{cm}^{-2}.\text{J}^{-1}$)	
	k1	k2
50	$3,22 \cdot 10^{-2}$	$1,38 \cdot 10^{-2}$
100	$2,53 \cdot 10^{-2}$	$1,61 \cdot 10^{-2}$
150	$3,91 \cdot 10^{-2}$	$1,62 \cdot 10^{-2}$
200	$3,68 \cdot 10^{-2}$	$6,9 \cdot 10^{-3}$

3-3-Analyses spectrométriques

Les mesures spectrométriques sont réalisées sur des solutions d'HpD ($5 \mu\text{g/ml}$) diluées dans du tampon phosphate (PBS, $\text{pH} = 7,2$) supplémentée de 10% de sérum de veau fœtal et photoirradiées en lumière bleue dans des conditions strictement similaires à celles des cellules. La puissance de la lumière émise est de 100 mW. L'irradiance est de $0,1 \text{ mW.cm}^{-2}$ et les fluences varient de 0,01 à 2 J.cm^{-2} .

3-3-1-Mesures spectrofluorimétriques

Le phénomène de photoblanchiment se manifeste par la modification de l'intensité de fluorescence et la modification de l'allure des spectres.

3-3-1-1- Diminution de l'intensité de fluorescence totale de l'HpD en solutions photoirradiées.

Pour démontrer toutes ces modifications spectrales, nous avons analysé les spectres d'émission des solutions témoins que nous avons comparé à ceux des solutions photoirradiées. Les mesures spectrofluorimétriques ont été réalisées avec une longueur d'onde d'excitation de 405 nm (bande d'absorption maximale de l'HpD) et l'émission est enregistrée sur un domaine spectral de 540 à 700 nm. Les spectres témoins démontrent deux pics d'émission majeurs à 624 nm et 682 nm (figure IX.12).

Après exposition des solutions à des fluences $\geq 0,1 \text{ J.cm}^{-2}$, une diminution nette des pics d'émission est constatée (pour une fluence de $0,5 \text{ J.cm}^{-2}$, la diminution est de 11,5 % à 624 nm et de 10 % à 682 nm), associée à une augmentation de la fluorescence entre 645 et 655 nm (figure IX.12), témoignant de l'apparition de photoproduits qui fluorescent à ces longueurs d'ondes. Ces observations sont en parfait accord avec les données obtenues par Moan qui a observé un épaulement similaire entre 645 et 650 nm sur des solutions de Pf II irradiées à des fluences de lumière élevées (Moan, 1986).

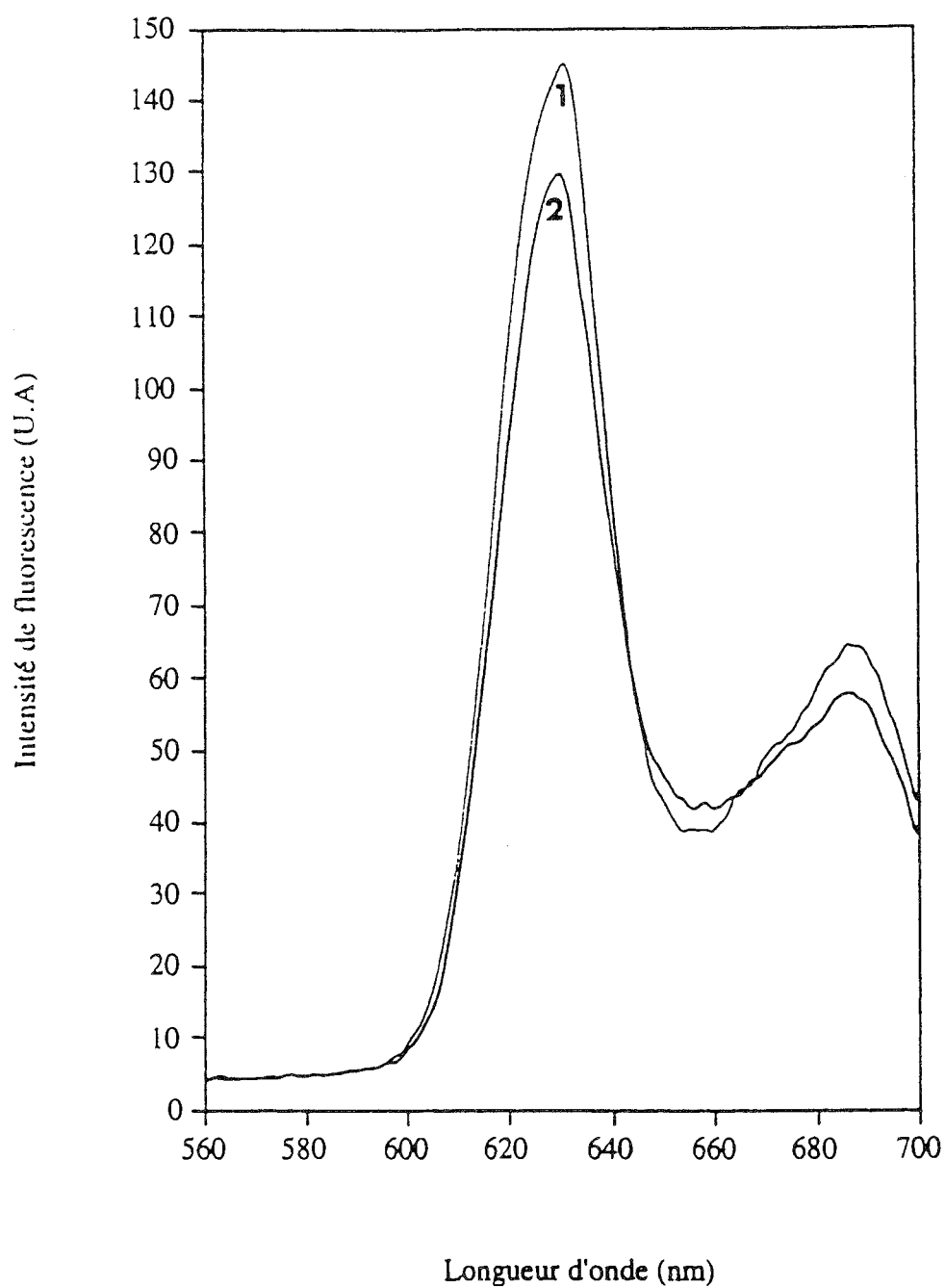


Figure IX.12 : Superposition d'un spectre d'émission de fluorescence témoin d'une solution d'HpD (5 $\mu\text{g/ml}$) diluée dans du PBS supplémenté de 10% de SVF (pH 7,4). (1) à un spectre d'émission d'une solution d'HpD identique mais photoirradiée à 0,5 J.cm^{-2} (2).

Nous avons réalisé ces mesures en spectrofluorimétrie pour mieux comprendre la photodégradation et la formation des photoproduits et pour comparer ces phénomènes à ceux qui surviennent en milieu intracellulaire. Pour pouvoir comparer les données obtenues par les deux méthodes de mesure (cytométrie en flux et analyse spectrale), il convient de considérer la valeur intégrale d'émission de fluorescence entre 600 et 700 nm puisque la fluorescence intracellulaire par cytométrie en flux est mesurée avec un filtre passe haut à 600 nm.

Les opérations d'intégration de la surface totale d'émission comprise entre 600 et 700 nm sont réalisées par le logiciel FLDM relié au système de mesures. Les valeurs obtenues sont ensuite reportées sur un graphe en fonction des fluences d'exposition en lumière bleue (figure IX.13).

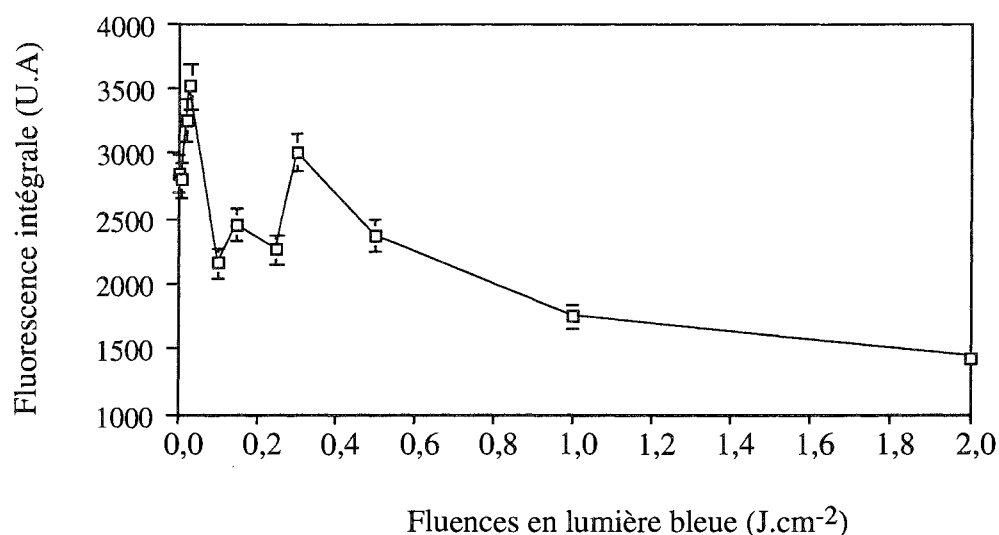


Figure IX.13 : Evolution de l'intensité de fluorescence intégrale entre 600 et 700 nm mesurée par spectrofluorimétrie sur solutions d'HpD supplémentées de 10% de sérum de veau fœtal et exposées à différentes fluences en lumière bleue. Chaque point représente la moyenne d'au moins trois essais.

La représentation des valeurs de fluorescence intégrale des spectres en fonction des photoirradiations (figure IX.13) démontre le même phénomène que celui observé au niveau intracellulaire par CMF. Une augmentation de la fluorescence initiale est observée pour les fluences inférieures à 0,03 J/cm² (temps d'exposition < 3 secondes), une diminution importante est ensuite enregistrée à 0,1 J/cm².

L'augmentation de la fluorescence initiale est comparable à ce qui se passe dans le milieu intracellulaire bien qu'elle soit obtenue dans un système expérimental où la liaison de l'HpD à des sites intracellulaires spécifiques n'est pas envisageable.

En raison de cette similitude, nous pouvons donc supposer que l'augmentation de la fluorescence initiale des cellules est plus imputable à une modification physico-chimique qu'à la translocation de l'HpD vers d'autres sites cellulaires. Cette modification chimique photoinduite comme nous l'avons déjà évoqué consisterait en une monomérisation des agrégats et/ou la formation de photoproduits fluorescents.

Au-delà de $0,1 \text{ J.cm}^{-2}$, la fluorescence intégrale augmente à nouveau jusqu'à rejoindre le niveau initial à $0,35 \text{ J.cm}^{-2}$ et ensuite décroître jusqu'à 2 J.cm^{-2} . La décroissance exponentielle enregistrée est spécifique au phénomène de photodégradation qui semble prédominer au sein de cet intervalle de fluences. La cinétique bi-exponentielle observée dans les essais de CMF n'est pas retrouvée en solution. Ceci conforte l'hypothèse d'une accumulation différentielle du photosensibilisateur à l'intérieur de la cellule et de l'existence de différentes cinétiques de photoblanchiment des porphyrines dans le milieu intracellulaire.

Comment justifier l'augmentation de fluorescence observée entre 0,1 et 0,35 J.cm⁻²?

L'hypothèse d'une apparition de nouveaux photoproduits fluorescents qui contribueraient à augmenter la fluorescence totale est à considérer.

3-3-1-2- Détermination et caractérisation des photoproduits de l'HpD par spectrofluorimétrie différentielle.

Dans l'objectif d'élucider les augmentations de fluorescence observées (figure IX.13), les mesures de spectrofluorimétrie différentielle ont été réalisées pour démontrer si ce phénomène est lié à l'apparition de nouveaux produits fluorescents ou simplement celui d'une monomérisation des espèces agrégées qui augmenterait globalement le niveau de fluorescence de l'HpD sans générer de nouveaux pics.

Ces mesures consistent à soustraire la surface intégrale de fluorescence d'une solution photoirradiée à celle d'une solution témoin, permettant ainsi de mettre en évidence les nouveaux pics de fluorescence relatifs à d'éventuels photoproduits. Ces opérations ont été effectuées sur une longueur spectrale de 600 à 700 nm.

Ainsi, pour les faibles fluences ($0,01$ à $0,02 \text{ J.cm}^{-2}$) apparaît un pic fin vers 640 nm qui disparaît complètement au-delà de 3 secondes d'exposition (fluences $> 0,03 \text{ J.cm}^{-2}$), ce qui montre la photostabilité de ces produits.

A partir de $0,1 \text{ J.cm}^{-2}$ (13 secondes d'exposition) apparaissent de nouveaux produits fluorescents dont l'émission est comprise entre 645 et 655 nm avec un pic majoritaire vers 651 nm et une diminution des pics d'émission à 624 et 682 nm . Un spectre différentiel typique est représenté sur la figure IX.14.

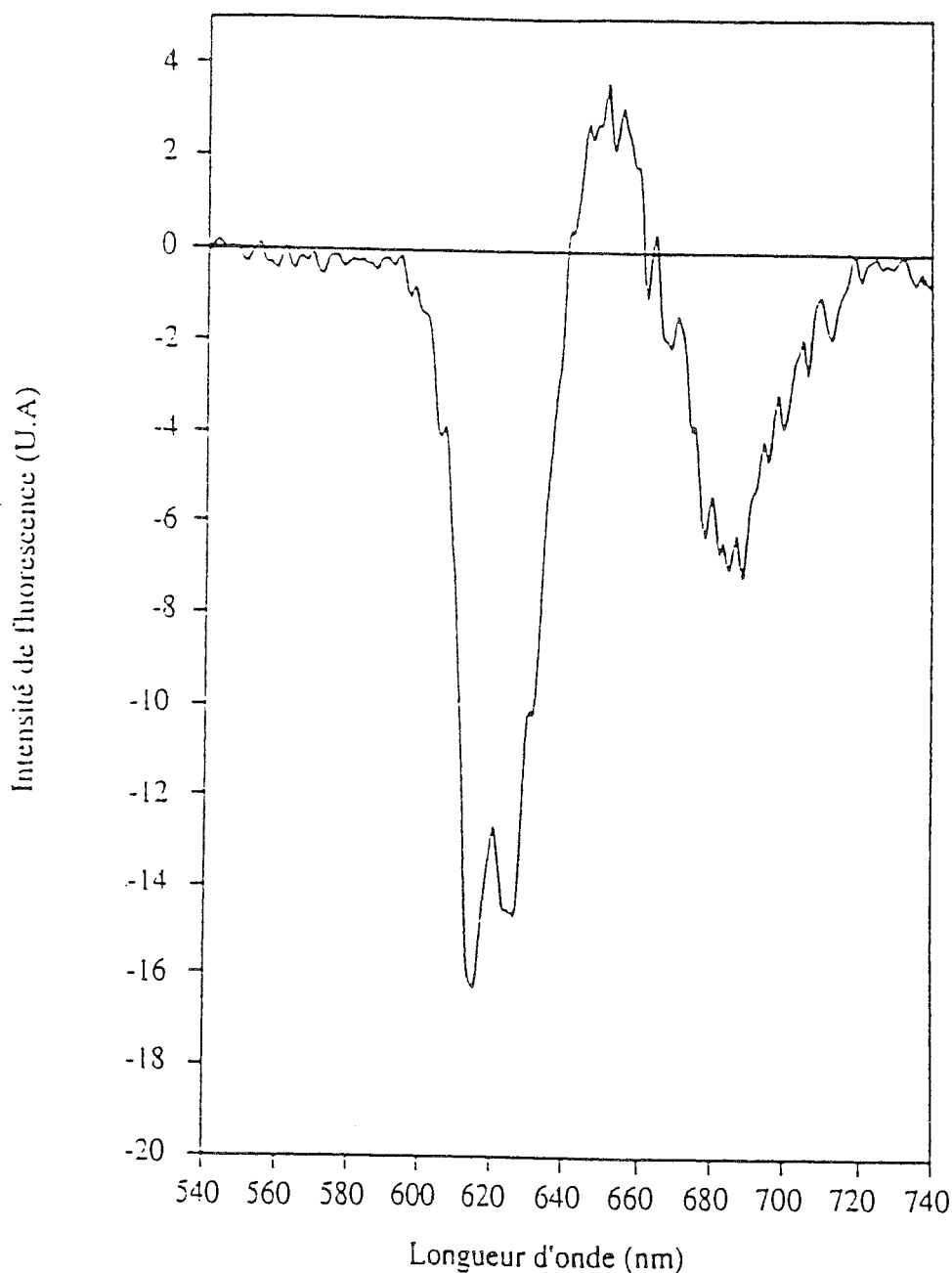


Figure IX.14: Spectre différentiel typique de fluorescence, obtenu par soustraction du spectre d'émission d'une solution d'HpD (5 mg/ml dilué dans du PBS supplémenté de 10% de SVF) photoirradiée à $0,5 \text{ J.cm}^{-2}$ au spectre d'une solution témoin équimolaire sans photoirradiation.

Pour illustrer la formation de ces produits, nous avons représenté en fonction des doses de lumière de photoirradiation, l'évolution de la valeur moyenne de fluorescence obtenue sur trois essais différents au niveau du pic à 651 nm.

La production de ces photoproduits semble dépendre des doses de lumière. Les photoproduits sont relativement photostables jusqu'à 1 J.cm^{-2} , ensuite le processus de photodégradation commence ce qui démontre que ces photoproduits ont une bande d'absorption vers la longueur d'onde de lumière qui les produit ($\lambda \leq 415 \text{ nm}$). Par ailleurs, si l'on compare ces résultats à ceux obtenus par cytométrie en flux, les plateaux de stabilisation de la fluorescence entre 0,1 et 0,25 J.cm^{-2} ainsi qu'entre 0,3 et 0,5 J.cm^{-2} sont probablement le fait de la contribution de ces photoproduits à la fluorescence intracellulaire intégrale mesurée.

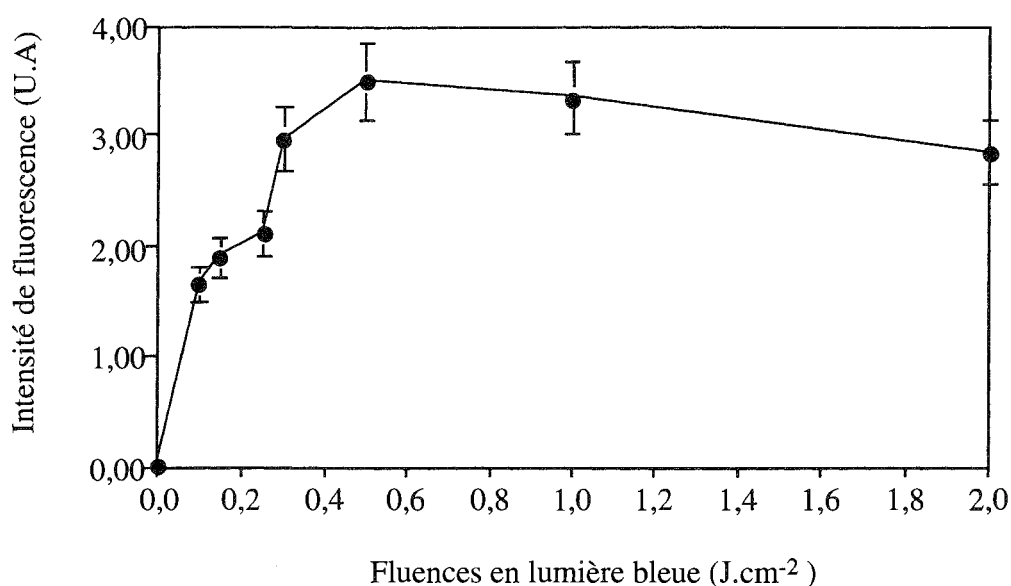


Figure IX.15: Formation des photoproduits émettant à 651 nm en fonction des doses de lumière bleue. Chaque point représente la moyenne d'un minimum de trois essais.

Parralèlement à toutes ces manifestations observées par spectrométrie de fluorescence, il est intéressant de comparer les modifications des spectres d'absorption afin de rechercher de nouvelles bandes d'absorption qui témoigneraient également de l'apparition de photoproduits.

3-3-2-Mesures spectrophotométriques

Les mesures en spectrométrie d'absorption sont également réalisées sur des solutions d'HpD (5 $\mu\text{g/ml}$) diluées dans du PBS (pH 7,2) supplémenté de 10% de SVF. Les solutions sont photoirradiées en lumière bleue ($P=100 \text{ mW}$) avec une densité de lumière de $0,1 \text{ mW.cm}^{-2}$ et des fluences variant entre $0,01$ et 2 J.cm^{-2} .

Les modifications des spectres d'absorption après photoirradiation sont démontrées par analyse des spectres d'absorption différentielle, obtenus en prenant comme ligne de base l'absorption d'une solution équimolaire d'HpD sans photoirradiation.

Sur la figure IX.16 est représenté un spectre typique d'absorption différentielle d'une solution d'HpD photoirradiée. Nous observons une nette diminution de l'absorption au niveau de la bande de Soret (de 370 à 420 nm) une augmentation de l'absorption entre 450 et 600 nm et l'apparition d'une nouvelle bande vers 642 nm.

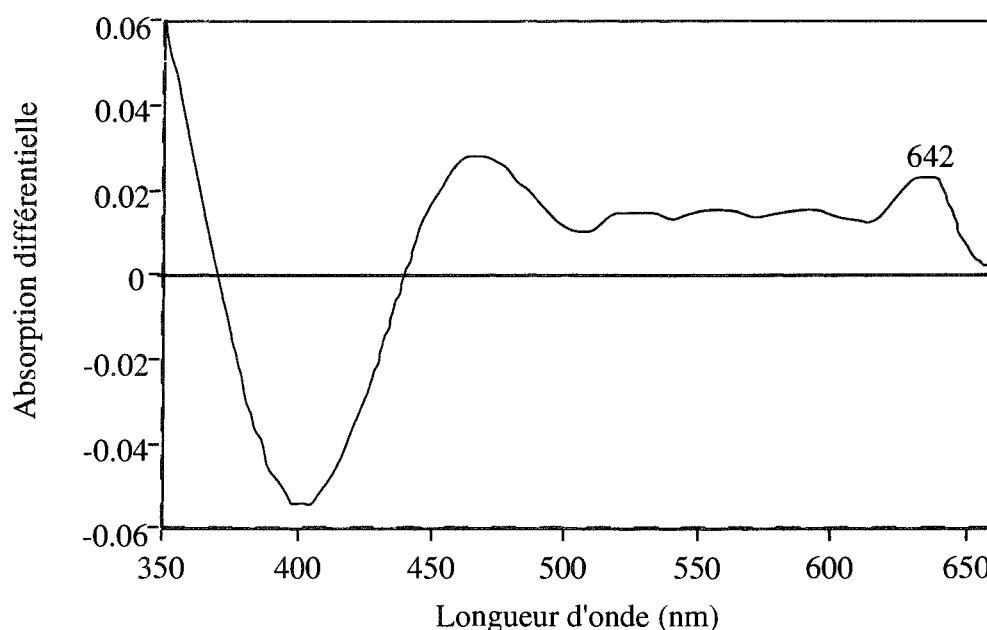


Figure IX.16: Spectre d'absorption différentielle d'une solution d'HpD (5 $\mu\text{g/ml}$ dans du PBS +10% sérum) exposée à la lumière bleue ($0,1 \text{ mW.cm}^{-2}$, $0,5 \text{ J.cm}^{-2}$).

3-3-2-1- Diminution de la bande de Soret

La diminution de l'absorption au niveau de la bande de Soret est caractéristique du phénomène de photodégradation et plus particulièrement de la destruction du noyau tétrapyrrolique des porphyrines.

Pour illustrer cette cinétique de photodégradation, nous avons reporté sur un graphe les valeurs moyennes de l'absorbance relative obtenues sur un minimum de trois spectres différentiels pour chaque fluence de photoirradiation (figure IX.17).

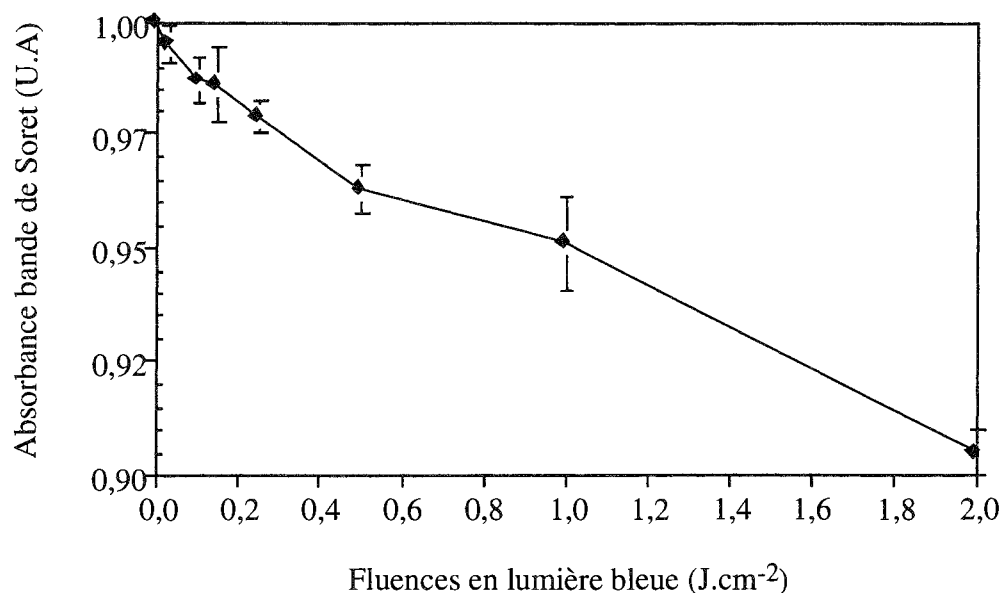


Figure IX.17: Diminution de l'absorbance au niveau de la bande de Soret en fonction des fluences en lumière bleue. Chaque point représente la moyenne obtenue sur trois essais.

Nous observons une cinétique de photodégradation très lente, de profil pluri-exponentiel Cette cinétique en plusieurs phases est typique des composés comme l'HpD contenant différentes espèces moléculaires (monomères, dimères et agrégats) qui dans un même environnement chimique ont des vitesses de dégradation différentes.

3-3-2-2- Formation d'une bande d'absorption à 642 nm

Hormis la diminution de l'absorption au niveau de la bande de Soret (figure IX.17) l'augmentation de l'absorption entre 400 et 650 nm révèle l'apparition de nouveaux photoproduits avec un pic vers 460 nm plus important que celui de la solution mère d'HpD et une nouvelle bande d'absorption vers 642 nm. Nous nous intéresserons plus particulièrement à cette nouvelle bande d'absorption dans le rouge qui est «spécifique» du photoproduit.

L'estimation quantitative de la formation des photoproduits absorbant à 642 nm est exprimée par le rapport de l'absorption à 642 nm de l'échantillon photoirradié sur celle de l'échantillon témoin à cette même longueur d'onde (figure IX.18).

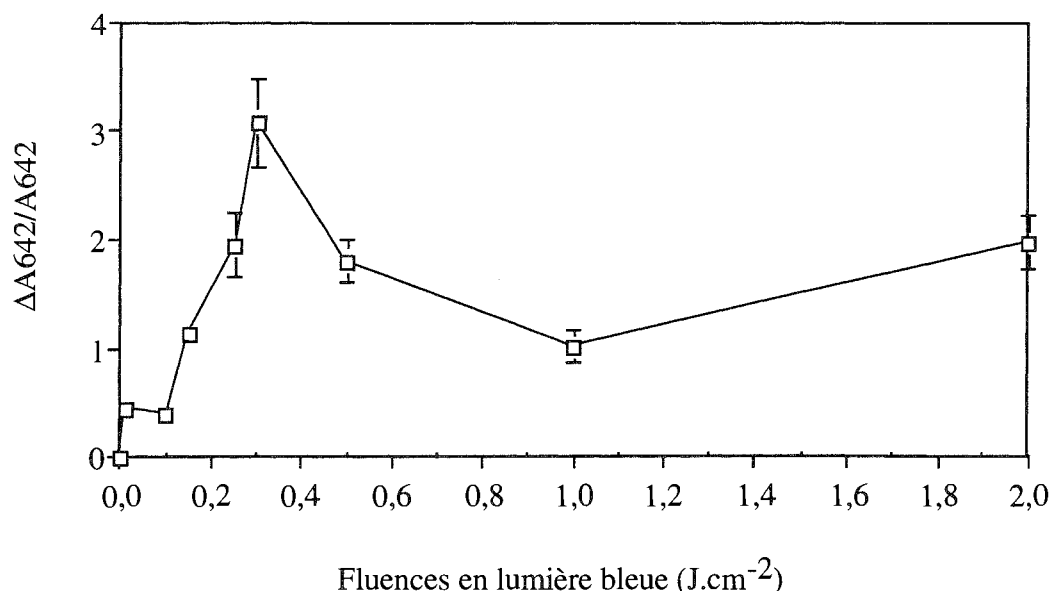


Figure IX.18 : Cinétique de formation des photoproduits en fonction des fluences d'exposition en lumière bleue, illustrée par l'absorbance relative de la solution irradiée à 642 nm comparée à celle de la même solution non irradiée ($\Delta A_{642}/A_{642}$). Chaque point représente la moyenne de trois essais.

Cette cinétique de formation démontre une production de ces produits très faible entre 0 et 0,1 J.cm^{-2} , plus importante jusqu'à 0,35 J.cm^{-2} où la valeur maximale est atteinte. Au-delà de cet intervalle et jusqu'à 1 J.cm^{-2} , la courbe présente une décroissance exponentielle probablement due à la photodégradation concomitante de ces produits. Une nouvelle augmentation apparaît vers 2 J.cm^{-2} . Ce phénomène d'augmentation et de diminution témoigne d'un équilibre compétitif entre la formation et la dégradation de ces produits.

Cette photodégradation révèle par ailleurs que ces photoproduits absorbent également la lumière bleue (vers 415 nm) qui les génère ce qui contribuerait à l'augmentation de l'absorption globale au niveau de la bande de Soret et expliquerait la cinétique de photodégradation observée (figure IX.17).

Il semble par ailleurs intéressant de noter que l'allure de la cinétique de formation de ces photoproduits est proche de celle des photoproduits fluorescents vers 650 nm (figure IX.15) ce qui suggérerait que les photoproduits qui absorbent à 642 nm soient peut être les mêmes que ceux qui fluorescent vers 650 nm. Néanmoins, il est très difficile d'accepter une telle hypothèse avant d'identifier chimiquement la nature de ces produits et d'étudier leur propriétés spectrales.

Notre étude étant plus vouée au domaine biologique, nous nous sommes intéressés à l'activité de ces produits dans le milieu intracellulaire plutôt qu'à leur structure chimique.

En considérant les résultats de cytotoxicité obtenus dans les essais de photoirradiations séquentielles et la cinétique de formation de ces produits, la photoinactivation des cellules semblerait être dépendante de la quantité de photoproduits formée lors de la première illumination en lumière bleue.

En effet, pour les fluences comprises entre 0,15 et 0,35 J.cm⁻² nous observons que la formation de ces photoproduits est maximale et que parallèlement l'effet négatif illustré par la valeur de I décroît considérablement. Il est par ailleurs intéressant de remarquer que pour 0,35 J.cm⁻², fluence qui correspond à l'une des valeurs maximales d'absorbance relative enregistrées sur la courbe de cinétique de formation (figure IX.18), une interaction nulle est obtenue pour les essais de cytotoxicité. Ceci supposerait que le niveau de production de ces photoproduits compenserait complètement la photodégradation de la molécule mère et qu'ils seraient eux-même des photosensibilisateurs cytotoxiques.

Pour les fluences supérieures à 0,35 J.cm⁻² (figure IX.18), une phase de décroissance exponentielle relative à la photodégradation simultanée de ces photoproduits est observée. Cette phase est illustrée dans les essais de cytotoxicité par l'augmentation de l'effet négatif au-delà de 0,35 J.cm⁻² (tableau IX.4).

Cette concordance des résultats illustre probablement que au sein de cet intervalle de fluences et dans nos conditions expérimentales, ces photoproduits exerceraient une activité photodynamique qui compenserait partiellement la perte d'activité engendrée par la dégradation de «la molécule mère d'HpD».

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La simulation de l'étape diagnostique par une illumination préalable des cellules à la lumière bleue ($\lambda < 415$ nm) a pour conséquence d'altérer l'efficacité de la lumière rouge (630 nm) délivrée à visée thérapeutique.

L'effet d'association des deux lumières a été démontrée par l'estimation de l'indice d'interaction I dont la valeur supérieure à 1 indique une interaction négative. Celle-ci pourrait être expliquée par la photodégradation de l'HpD lors de la première illumination.

Cependant, cet effet a tendance à s'estomper aux fluences d'exposition en lumière bleue supérieures à $0,1 \text{ J.cm}^{-2}$ ce qui suggère l'existence de deux phénomènes simultanés : photodégradation des molécules initiales et formation de photoproduits pourvus d'une activité photodynamique.

Nos résultats expérimentaux confrontés aux données bibliographiques (cf chapitre XII, 7-2), nous permettent de conclure que la variation d'indice d'interaction I observée sur nos essais de cytotoxicité est le fait de la contribution photodynamique des photoproduits et de la photodestruction des porphyrines.

Ces photoproduits absorbent plus efficacement la lumière rouge et leur absorption à des longueurs d'onde plus grandes permet une pénétration plus importante dans les tissus biologiques.

Ainsi, si lors de l'étape thérapeutique nous envisageons une illumination simultanée avec deux raies de lumières la première susceptible d'exciter la molécule mère d'HpD ($\lambda = 630 \text{ nm}$) et la seconde les photoproduits ($\lambda = 642 \text{ nm}$) on pourrait non seulement solliciter la molécule mère d'HpD mais également ses photoproduits à leur longueur d'onde d'absorption maximale. L'efficacité photodynamique pourrait être ainsi améliorée et la photodégradation compensée par exploitation en temps réel des produits de la phototransformation.

CHAPITRE X

ÉTUDE DE L'INFLUENCE DU MICROENVIRONNEMENT SUR LE PHOTOBLANCHIMENT DE L'HPD.

ANALYSE COMPARATIVE DES CINÉTIQUES DE PHOTODÉGRADATION ÉVALUÉES PAR MÉTHODES SPECTROSCOPIQUES ET PAR UN TEST BIOLOGIQUE DE LA PHOTO- INACTIVATION CELLULAIRE

1-Introduction

Dans les phénomènes photobiologiques, le microenvironnement chimique est une donnée importante aussi bien pour les réactions de phototoxicité cellulaire que pour les réactions de photodégradation du chromophore. Nous nous sommes intéressés à l'interaction de l'HpD avec les protéines du sérum par l'étude des propriétés spectroscopiques du photosensibilisateur et sa cinétique de photoblanchiment. Nous avons également visualisé le phénomène de photoblanchiment par des images réelles de l'extinction de fluorescence de l'HpD intracellulaire et montré la différence de cinétique de la photodégradation en fonction de la localisation sub-cellulaire.

La photodégradation de l'HpD se manifeste par la modification de ses propriétés spectroscopiques et par la diminution de son pouvoir photo-oxidatif. Dans cette étude, nous avons réalisé une analyse comparative des cinétiques de photodégradation évaluées à partir de ces différentes propriétés.

Nous avons montré dans le chapitre IX que l'exposition séquentielle des cellules à la lumière engendrait une réduction de la photoinactivation en raison de la photodégradation de l'HpD intracellulaire.

Cependant, la complexité du microenvironnement cellulaire ainsi que la composition chimique hétérogène de l'HpD entravent toute évaluation quantitative rigoureuse du photoblanchiment. En effet, dans un tel environnement l'altération de la cytotoxicité peut être le fait de divers évènements qui se superposent dont la modification physico-chimique photoinduite de l'HpD.

La complexité chimique de l'HpD et la différence du degré d'hydrophobicité de ses composants engendrent une hétérogénéité de distribution subcellulaire qui confère des ordres de cinétique de photodégradation différents selon le compartiment cellulaire

considéré. Ces différentes données peuvent modifier le taux global du photoblanchiment de l'HpD dans la cellule.

Ainsi pour nous affranchir des difficultés inhérentes au milieu intracellulaire, nous avons élaboré une nouvelle approche expérimentale qui consiste à pré-irradier les solutions d'HpD à différentes fluences, de les mettre ensuite au contact des cellules et d'évaluer la perte de cytotoxicité par rapport à une solution témoin non photoirradiée. L'évaluation directe de la photodégradation des porphyrines sera estimée à partir de la diminution du pouvoir cytotoxique de l'HpD pré-irradiée. La constante de photoblanchiment obtenue sera comparée à celles obtenues par spectrofluorimétrie et spectrométrie d'absorption.

2-Matériel et méthodes

2-1- L'hématoporphyrine dérivée

Solution injectable à 5 mg/ml d'origine australienne (Queen Elizabeth Hospital, Woodville, Australie). Les différentes concentrations sont obtenues par dilution de la solution mère soit dans du PBS ou dans du PBS supplémenté de 2% de sérum de veau fœtal (SVF).

2-2- Lignée et culture cellulaires

La lignée cellulaire utilisée est la même que celle décrite précédemment, le carcinome de côlon humain (HT-29). Les cellules sontensemencées dans des boîtes de culture de 96 puits à raison de $2 \cdot 10^4$ cellules par puits. Trois jours après ensemencement, le milieu est aspiré et les cellules sont incubées en présence d'HpD (2,5 ; 5 et 7,5 $\mu\text{g/ml}$). Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant 2 heures, lavées au P.B.S pour évacuer les porphyrines non-incorporées puis replacées dans du milieu complet (avec 10% de SVF) avant d'être exposées à la lumière.

2-3- Les photoirradiations

2-3-1- La source de lumière

Laser krypton (Spectra Physics 2020) délivrant la lumière à une longueur d'onde inférieure à 415 nm (deux raies principales à 407 et 413 nm). La puissance de la lumière émise est de 100 mW. La densité de lumière (irradiance) utilisée est de 0,1 mW.cm^{-2} .

2-3-2- photoirradiations des solutions d'HpD

2 ml de solutions d'HpD à des concentrations différentes (2,5 ; 5 et 7,5 µg/ml) sont exposées à la lumière dans des boîtes de pétri de 35 mm de diamètre soit une hauteur du liquide de 4 mm, à des fluences variant de 0,01 à 7 J.cm⁻². Ces solutions sont maintenues dans des conditions strictes de stérilité et d'obscurité, elles sont ensuite mises immédiatement au contact des cellules ou analysées par les méthodes spectrométriques.

2-3-3- photoirradiation des cellules

Après incubation des cellules avec les différentes solutions de porphyrines photoirradiées, les boîtes de culture multipuits sont exposées à la lumière bleue ($\lambda \leq 415$ nm). La puissance en sortie de fibre est de 100 mW et la fluence utilisée est 0,5 J.cm⁻². Les cellules ainsi traitées sont ensuite conservées pendant 48 heures à 37°C.

2-4- Essai de cytotoxicité

L'essai de cytotoxicité est réalisé selon le même protocole que celui décrit dans le chapitre précédent (cf chapitre IX, 2-4). Les résultats sont exprimés en pourcentage de prolifération cellulaire par rapport à un témoin non traité et comparés à ceux obtenus dans les mêmes conditions avec les solutions de porphyrines non-photoirradiées. Toutes les mesures ont été répétées à trois reprises, chaque série correspond à la moyenne de 8 points d'essai.

Le protocole global de l'essai expérimental est rapporté de façon schématique sur la figure X.1.

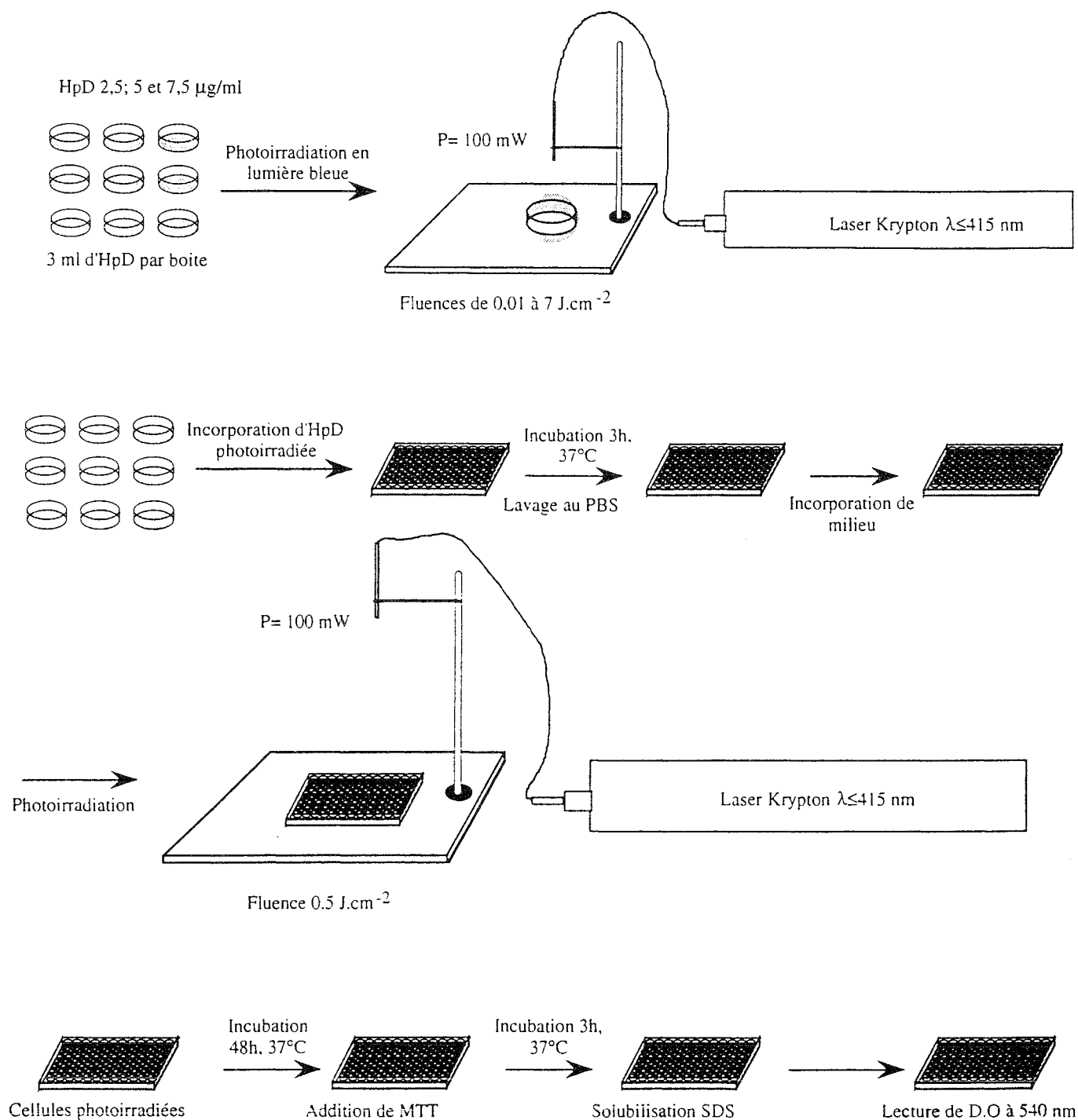


Figure X.1 : Schéma du protocole expérimental de l'évaluation des cinétiques de photodégradation par le test biologique de cytotoxicité au MTT.

2-5-Spectrométrie

2-5-1-Spectrofluorimétrie

Les spectres de fluorescence sont mesurés avec un spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS 50B relié à un logiciel (FL Data Manager) qui permet de restituer les données sous forme de spectres et de gérer sur toute la longueur spectrale les opérations d'intégration, de soustraction ainsi que diverses autres fonctions.

2-5-2-Spectrophotométrie

Les spectres d'absorption sont réalisés sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer (UV-visible Lambda-Bio) géré par le logiciel PECSS. Les spectres sont lus sur une longueur spectrale de 350 à 700 nm.

2-6-Microscopie de fluorescence et analyse d'images

2-6-1-Préparation des cellules

La lignée cellulaire HT29 est cultivée dans du RPMI 1640 supplémenté de sérum de veau fœtal (10%). Les cellules ont été incubées en présence d'HpD (50 µg/ml) pendant 18 h. Après lavage, les cellules sont trypsinées, remises en suspension dans du tampon PBS et analysées par microscopie de fluorescence.

2-6-2- Microscopie de fluorescence

Le microscope de fluorescence utilisé (Zeiss) possède une source de lumière blanche à vapeur de mercure. La longueur d'onde d'excitation est obtenue par un filtre passe-bas (480 nm) et l'émission est recueillie par un filtre passe bande centré sur 630 nm. Le signal est ensuite traité par une caméra haute sensibilité (Hamamatsu C2400) capable de détecter des intensités lumineuses jusqu'à 10^{-4} lux. Le signal vidéo issu de la caméra est

ensuite transmis à une unité de traitement d'image. Celle-ci comprend un micro-ordinateur de type IBM PC (microprocesseur 80386) cadencé à 25 MHz équipé d'une carte MVP (Matrox Vision Processor) munie d'un processeur spécialisé en traitement d'image.

Les résultats sont visualisés en comparant des images recueillies dans une zone de 150 x 150 pixels contenant une cellule isolée. L'acquisition d'images est réalisée pendant 40 secondes. Une quantification relative du phénomène est effectuée par extraction de la valeur moyenne d'intensité lumineuse de la zone observée.

Cette partie du travail a été réalisée par l'équipe du LAB.EL sous la direction des professeurs Schultz et Jaquet (Maire 1995) en collaboration avec le centre hospitalier de Mulhouse (Dr. Jung).

3-Résultats et discussion

3-1-Effets de l'interaction de l'HpD avec les protéines du sérum

Les protéines du sérum peuvent jouer un grand rôle dans la modification des propriétés spectroscopiques de l'HpD ainsi que son incorporation cellulaire.

3-1-1- Effet sur l'incorporation et la rétention de l'HpD par les cellules

Pour démontrer l'effet des protéines sériques sur la rétention cellulaire de l'HpD, nous avons incubé des cellules HT29 pendant 2 heures à 37°C en présence de solutions d'HpD à 5 µg/ml diluées dans du PBS contenant des taux variables de sérum de veau fœtal (SVF). Les cellules ainsi traitées sont ensuite analysées par cytométrie en flux (cf chapitre IX, 2-5). Les valeurs de fluorescence intracellulaire obtenues par CMF sont exprimées en valeurs relatives par rapport à un témoin sans sérum (100% de fluorescence en unités arbitraires).

Une diminution d'environ 60% de la fluorescence est observée sur les cellules incubées en présence de 2% de sérum, ensuite cette diminution évolue beaucoup plus lentement entre 2% et 5% (22% de perte de fluorescence) jusqu'à atteindre un plateau de valeurs constantes entre 5 et 15 % de sérum (figure X.2).

Comment expliquer que pour une durée d'incubation et une quantité d'HpD identiques, une différence très nette de fluorescence apparaît entre le témoin et les essais avec sérum?

Sachant que les conditions expérimentales sont strictement les mêmes, seule une modification d'incorporation, de rétention ou de clairance cellulaire de l'HpD pourraient justifier une telle différence.

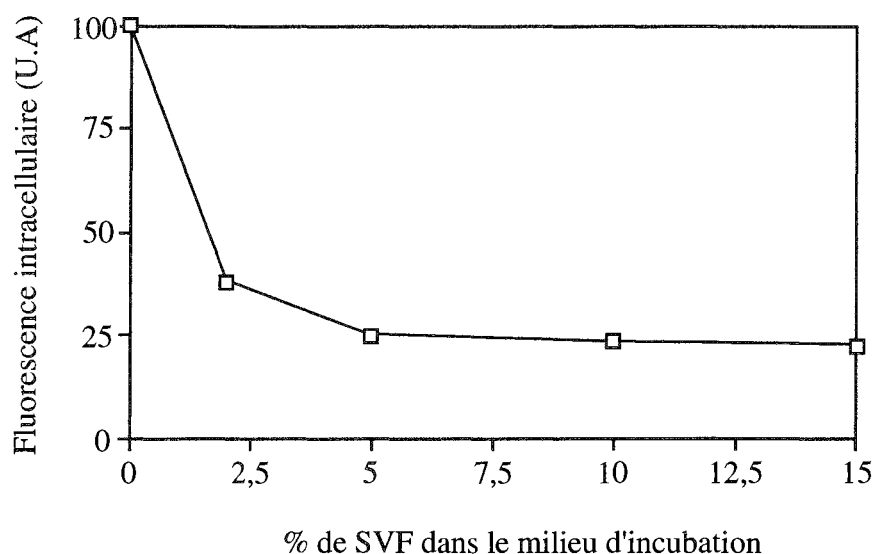


Figure X.2 : Variation de la fluorescence intracellulaire en fonction du pourcentage de sérum dans le milieu. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne de trois essais et en raison de la faible importance des erreurs standards, elles sont dissimulées par les symboles du graphique.

Pour expliquer ce phénomène, il faut évoquer le rôle des protéines du sérum dans la désagrégation des espèces oligomériques et dans la clairance des porphyrines. En effet, l'environnement hydrophobe créé par les protéines conduit à un effet de dépliement des liaisons éther et ester des polymères, ce qui confère aux porphyrines des caractéristiques similaires à celles des monomères (Cubbedu *et al*, 1987). Les espèces monomériques sont incorporées et éliminées de la cellule beaucoup plus rapidement que les dimères et les oligomères (Moan et Sommer, 1983 ; Dellinger et Brault, 1992).

Moan (1984) a suggéré que les protéines sériques interagissaient plus particulièrement avec le matériel lipophile localisé sur la membrane externe de la cellule. Ainsi, la clairance rapide de l'HpD suggérerait qu'en présence des protéines du sérum dans l'environnement cellulaire, la lipophilicité des porphyrines est modifiée ce qui faciliterait ainsi leur élimination de la cellule (Korberlik, 1993).

L'allure exponentielle de la courbe suggère un phénomène de saturation des liaisons protéine-porphyrine à partir de 5% de sérum dans le milieu. Aux vues de nos résultats et des données citées ci dessus, nous pourrions conclure que la présence de SVF dans le milieu d'incubation modifie très sensiblement (jusqu'à 80 % en présence de 5% de SVF) le pourcentage de rétention de l'HpD par la cellule ce qui n'est certainement pas sans conséquences sur le pouvoir de photoinactivation par PDT.

3-1-2-Influence sur l'effet cytotoxique

Pour démontrer l'effet du sérum sur la modification du pouvoir de photo-inactivation cellulaire, nous avons comparé les niveaux de cytotoxicité obtenus avec des cellules HT29 incubées pendant deux heures à différentes concentrations d'HpD dans des milieux contenant des taux de sérum de 2% ou 10%. Les cellules sont ensuite lavées et exposées à une dose fixe de lumière bleue ($\lambda < 415$ nm, fluence = $0,5 \text{ J.cm}^{-2}$). L'essai de cytotoxicité au MTT est réalisé après un délai de 48 heures selon le protocole décrit précédemment.

Si l'on considère la CI50 (figure X.3), dans le milieu contenant 2 % de SVF une concentration de 4 $\mu\text{g/ml}$ est suffisante pour induire 50% d'inhibition de la croissance cellulaire alors que le même effet requiert une concentration de 18 $\mu\text{g/ml}$ dans le milieu contenant 10% de sérum. Nous pourrions trouver l'explication de cette différence de cytotoxicité dans les phénomènes de monomérisation, de désagrégation et de clairance cellulaire évoqués dans le paragraphe précédent.

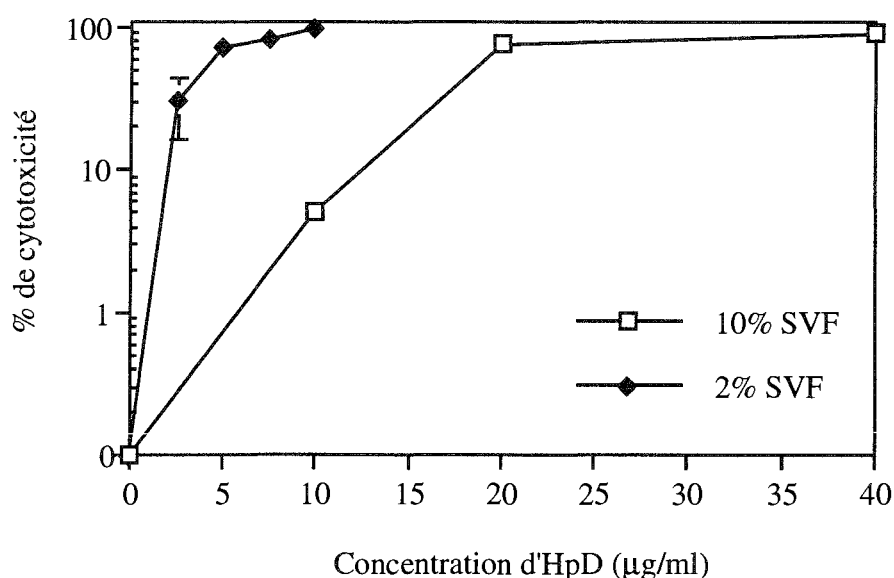


Figure X.3 : Courbe de cytotoxicité des cellules HT29 en fonction de la concentration en HpD et en présence de taux différents de sérum dans le milieu d'incubation. Chaque point représente la moyenne de trois essais indépendants.

3-1-3-Influence sur les propriétés spectroscopiques de l'HpD en solution

Avant de discuter les variations des propriétés de fluorescence et d'absorption de l'HpD en présence des protéines du sérum, les caractéristiques spectrales des différentes espèces moléculaires constituant l'HpD doivent être distinguées.

En solution aqueuse, la fluorescence de l'HpD est due essentiellement aux composantes monomériques comme l'Hp ou l'HVD. Leur maximum d'excitation se situe vers 390-400 nm et leur émission vers 610-615 nm (Moan et Sommer, 1981). Une faible intensité de fluorescence peut également provenir des dimères et oligomères dont le pic d'excitation maximal se situe vers 395-405 nm et leur émission vers 620-625 nm (Moan et Sommer, 1981 ; Pottier et Truscott, 1986).

Cependant, dans un milieu aqueux et aux conditions de pH physiologique, les oligomères et les monomères peuvent également se présenter sous des formes extrêmement agrégées qui empêchent toute détection par fluorescence. En revanche, ils sont discernables au niveau du spectre d'absorption avec un pic maximal à 360-370 nm pour les oligomères et de 370-375 nm pour les monomères. Par ailleurs, les mêmes composantes libres présentent sur le spectre d'absorption des bandes de Soret déplacées vers le rouge, 390-400 nm pour les monomères et 395-405 nm pour les dimères et les oligomères (Brown *et al*, 1976 ; Pottier et Truscott, 1986).

A partir de ces données et de nos propres spectres témoins, nous pourrions déterminer les variations spectroscopiques qui surviennent en présence de sérum.

3-1-3-1-Modification du spectre d'absorption

En absence de sérum et dans les conditions de pH physiologique (pH 7,4) le spectre d'absorption d'une solution d'HpD (5 µg/ml) dans du PBS révèle des pics d'absorption à 620, 567, 537, 503 et 370 nm. L'amplitude du pic vers 370 nm est au moins 30 fois supérieure à celle du pic à 620 nm et sa présence révèle l'importance des formes agrégées des monomères et des oligomères dans le milieu (figure X.4, spectre 1).

En présence de 2% de SVF (pH 7,4), un léger déplacement vers le rouge est enregistré (environ 3 nm) et les pics se situent à 623, 570, 540 et 506. La bande de Soret est beaucoup plus large et présente deux bandes distinctes à 381nm et 395 nm (figure X.4, spectre 2) qui témoignent de la coexistence de différentes espèces moléculaires, la bande à 395 nm est typique des monomères et oligomères libres et la bande à 380 nm est typique des monomères et oligomères agrégés. Ainsi, la présence de sérum dans le

milieu suggère un processus de désagrégation des polymères de porphyrines associées par des liaisons non-covalentes.

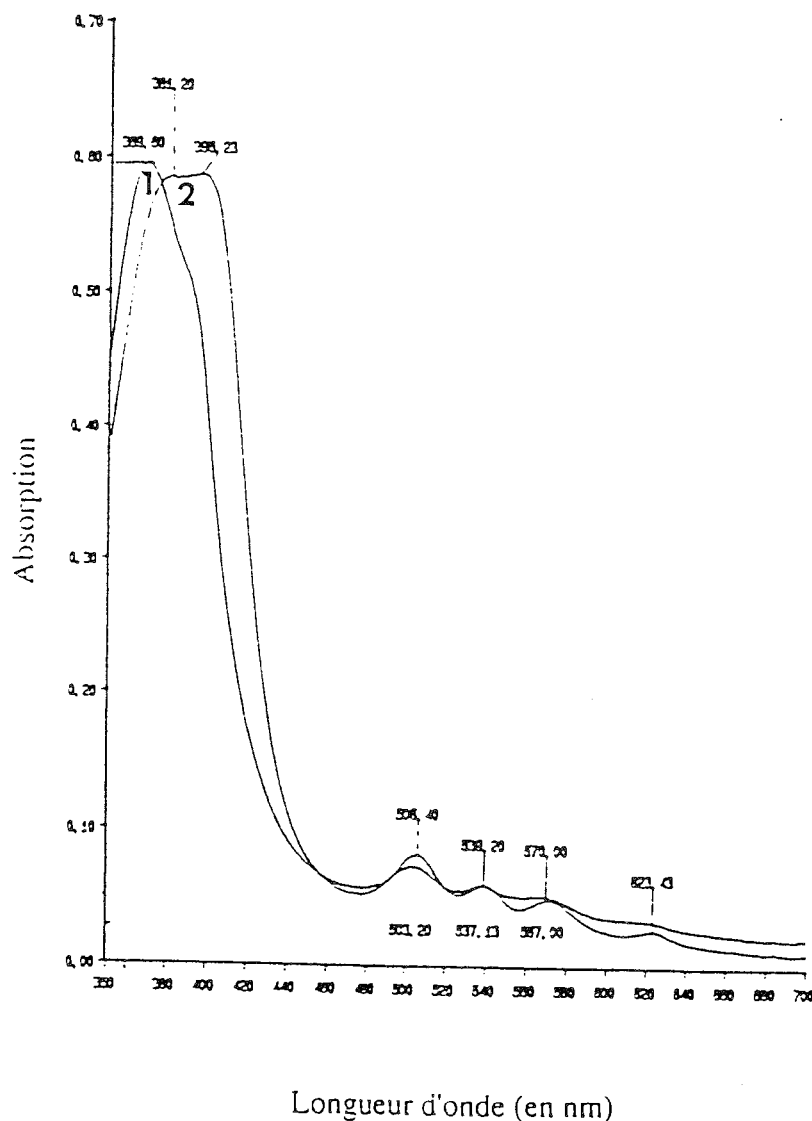


Figure X.4 : Spectres d'absorption d'une solution d'HpD (5 µg/ml) dans du tampon phosphate (PBS, pH 7,4) sans sérum (1), avec 2% de SVF (2).

3-1-3-2-Modification du spectre d'émission de fluorescence

Le spectre de fluorescence d'une solution d'HpD (5 µg/ml, pH 7,4) dans du PBS, présente un pic à 615 nm et un second à 675 nm (figure X.5, spectre 1). En présence de 2 % de SVF les pics sont déplacés vers le rouge à des longueurs d'ondes respectives de 624 et 682 nm (figure X.5, spectre 2) et leur intensité de fluorescence est deux fois supérieure. Cette augmentation de fluorescence de l'HpD en présence des protéines du sérum, suggère également l'apparition d'espèces monomériques fluorescentes provenant de la monomérisation des porphyrines agrégées (Smith, 1985 ; Poletti *et al*, 1984).

D'autre part, le déplacement des bandes d'émission vers le rouge est probablement dû au changement des taux relatifs des différentes espèces moléculaires ainsi qu'au caractère hydrophobe des liaisons porphyrine-protéine (Korberlik et Hung, 1991). En effet, la liaison des monomères avec les protéines du sérum telles l'albumine ou les LDL induit le déplacement du pic de 615 nm relatif aux monomères libres vers 624 nm (Smith et Neuschatz, 1983 ; Reyfmann *et al*, 1984).

3-1-3-3-Modification du spectre d'excitation de fluorescence

Les spectres d'excitation de fluorescence sont enregistrés au niveau des bandes d'émissions maximales dans les deux milieux. En solution aqueuse dans du PBS, le spectre d'excitation de fluorescence de l'HpD est enregistré à une longueur d'onde d'émission de 615 nm et les pics détectés se situent à 395, 500, 537 et 557 nm (figure X.6, spectre 1). Par opposition au spectre d'absorption le pic majoritaire se trouve à 395 nm et non à 370 nm ce qui témoigne que dans cette solution, malgré l'importance des espèces agrégées seules les composantes monomériques fluorescent. En effet, les monomères sont connus pour avoir leur maximum d'excitation vers 390-400 nm et leur émission vers 610-615 nm (Moan et Sommer, 1981).

En présence de sérum, le spectre est enregistré à une longueur d'onde d'émission maximale de 625 nm. En comparaison avec la solution d'HpD dans du PBS, les pics sont décalés vers des longueurs d'onde supérieures : 403, 505, 541, et 565 nm (figure X.6, spectre 2). La bande de Soret est beaucoup plus large et son intensité plus importante, la largeur du pic à mi-hauteur est de 30 nm dans du PBS et de 45 nm en présence du SVF, les intensités d'absorption sont respectivement de 116 et 145 (en unités arbitraires). Cette modification de l'allure au niveau de cette bande témoigne d'une part de l'apparition d'espèces fluorescentes obtenues par monomérisation des espèces agrégées et d'autre part révèle la contribution de la fluorescence des dimères et oligomères dont le pic d'excitation maximal se situe vers 395-405 nm (Moan et Sommer, 1981 ; Pottier et Truscott, 1986).

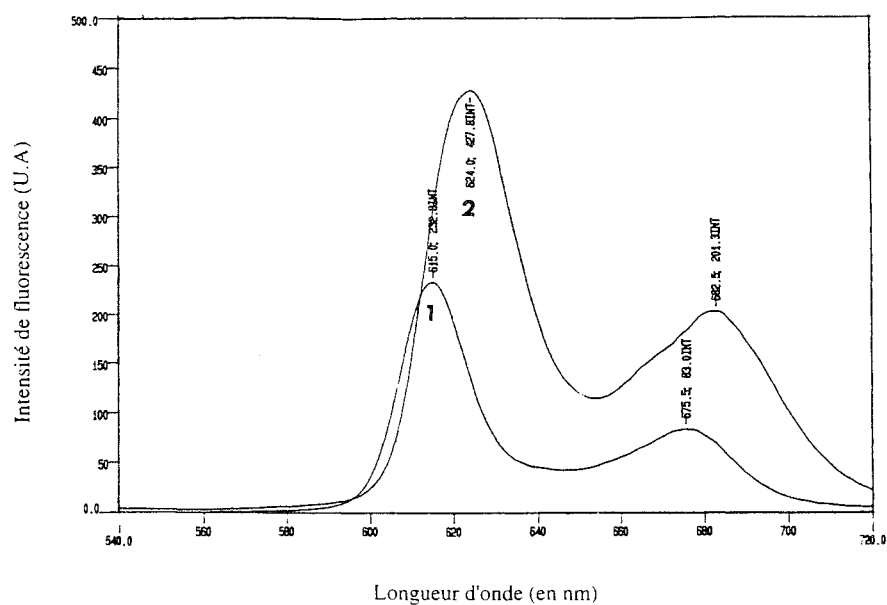


Figure X.5 : Spectres d'émission de fluorescence d'une solution d'HpD (5µg/ml) dans du tampon phosphate (PBS, pH 7,4) sans sérum (1), avec 2% de SVF (2).

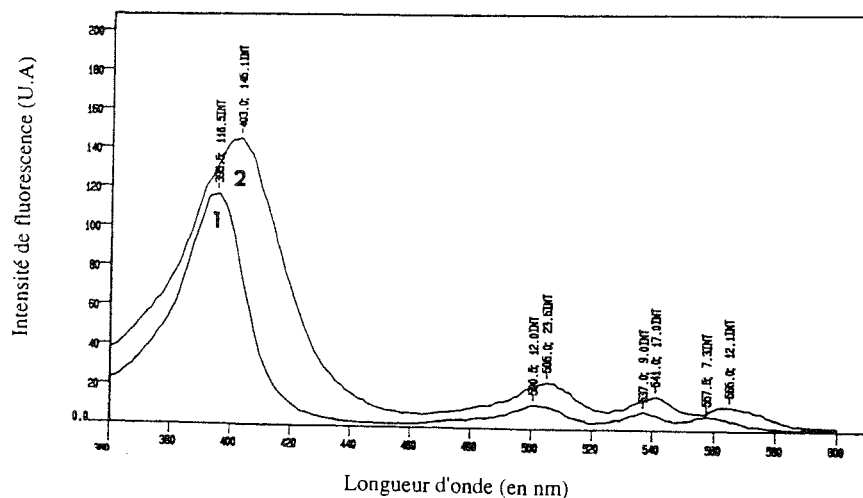


Figure X.6 : Spectres d'excitation de fluorescence d'une solution d'HpD (5µg/ml) dans du tampon phosphate (PBS, pH 7,4) sans sérum (1, détecté à 615 nm), avec 2% de SVF (2, détectée à 625 nm).

3-2- Analyse comparative des cinétiques de photoinactivation de l'HpD dans différents microenvironnements

Le photoblanchiment a pour conséquences la modification des propriétés d'absorption et de fluorescence de la molécule, ainsi qu'une diminution de ses propriétés photooxydatives. Dans cette étude, notre objectif est d'évaluer le taux de photoblanchiment de l'HpD dans des micro-environnements chimiques différents en exploitant les trois effets suivants :

- la décroissance de l'absorbance au niveau de la bande de Soret ;
- la décroissance de la fluorescence au niveau du pic d'émission majoritaire ;
- la diminution de l'effet cytotoxique.

3-2-1-Etude spectrométrique de la photodégradation de l'HpD en solution

Pour réaliser cette étude, nous avons photoirradié les solutions d'HpD diluées dans du PBS seul ou supplémenté de 2% de SVF à différentes fluences (0,1 à 2 J.cm⁻²). Les solutions ainsi traitées sont maintenues à l'obscurité totale avant analyse spectrométrique. Toutes les mesures sont reproduites au moins cinq fois.

3-2-1-1-Décroissance de l'absorption au niveau de la bande de Soret

L'une des caractéristiques du phénomène de photoblanchiment est la décroissance de l'absorption au niveau de la bande de Soret, témoin de la photodestruction du noyau tétrapyrrolique des porphyrines.

Selon le microenvironnement chimique de l'HpD, l'absorption au niveau de la bande de Soret des espèces photochimiquement actives peut être plus ou moins décalée vers des longueurs d'onde supérieures. Ainsi en présence de SVF dans le milieu, la bande de Soret est centrée à 403 nm et dans un milieu sans sérum (dans du PBS) elle est centrée à 395 nm (figure X.5). La détermination de la cinétique de photodégradation de l'HpD sera extrapolée de la décroissance de la bande de Soret dans chacun des deux milieux.

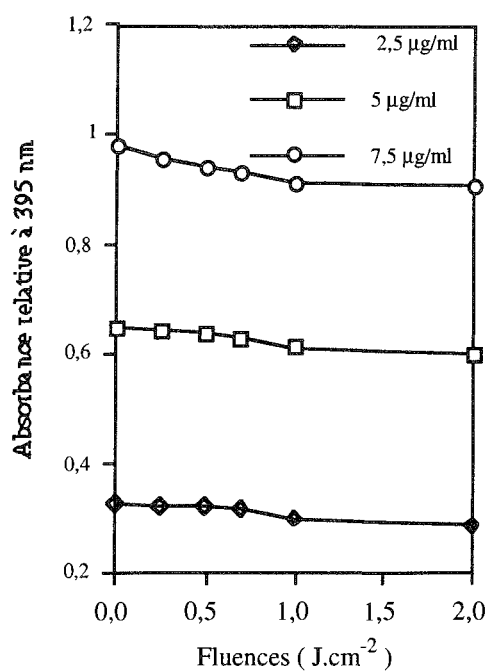


Figure X.7 : Courbe d'évolution de l'absorption à 395 nm pour des solutions d'HpD diluées dans du PBS (sans sérum) photoirradiées à différentes fluences.

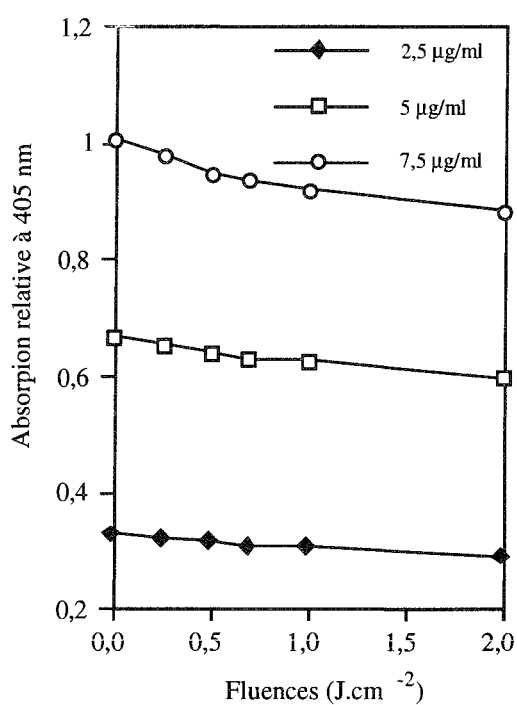


Figure X.8 : Courbe d'évolution de l'absorption à 403 nm pour des solutions d'HpD diluées dans du PBS supplémenté de 2% de SVF, photoirradiées à différentes fluences.

Les figures X.7 et X.8 illustrent le profil type de la photodestruction de la bande de solet dans chacun des deux milieux. Nous observons que la décroissance de l'absorption en fonction des fluences évolue selon une cinétique très lente. En effet, pour une concentration de 5 µg/ml d'HpD et une fluence de photoirradiation de 2 J.cm⁻², l'évaluation de la décroissance d'absorption par rapport à la valeur initiale est de l'ordre de 6 % en présence de sérum et de 2,5 % dans les solutions de PBS.

Les constantes de photodégradation dans chacun des deux milieux et pour les trois concentrations d'HpD utilisées, sont calculées à partir de la décroissance exponentielle initiale des courbes. Les constantes obtenues correspondent à la moyenne des valeurs calculées sur cinq essais indépendants (tableau X.1).

Tableau X.1 : Constantes de photodégradation calculées à partir de la décroissance d'absorption au niveau de la bande de solet dans des solutions d'HpD avec sérum ($\lambda_{solet}=403$ nm) ou sans sérum ($\lambda_{solet}=395$ nm). Les valeurs calculées représentent la moyenne $\pm$ écart-type sur cinq essais.

HpD (µg/ml)	Constantes de photodégradation en cm ² .J ⁻¹		
	PBS	SVF	SVF/PBS
2,5	0,018 $\pm$ 0,001	0,035 $\pm$ 0,003	1,94
5	0,015 $\pm$ 0,003	0,035 $\pm$ 0,004	2,33
7,5	0,024 $\pm$ 0,006	0,045 $\pm$ 0,007	1,88

la comparaison des constantes de photodégradation obtenues dans les deux milieux démontre que la présence de sérum augmente significativement (environ deux fois) la photodestruction de l'HpD.

3-2-1-2-Décroissance de fluorescence

La décroissance de l'intensité de fluorescence des spectres est évaluée par rapport au pic d'émission majoritaire des solutions à 615 nm en absence de sérum et à 624 nm en présence de sérum. Les figures X.9 et X.10 représentent le profil type de la décroissance de fluorescence dans chacun des deux micro-environnements. Les constantes de

photodégradation correspondent aux pentes des courbes, calculées à partir de la décroissance exponentielle initiale. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne de cinq essais indépendants.

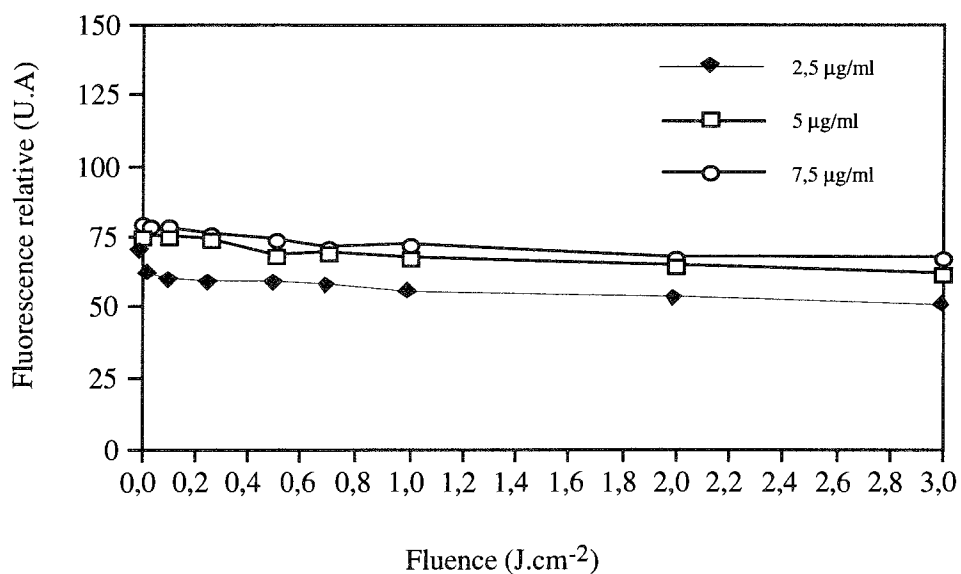


Figure X.9 : Courbe de décroissance de l'intensité du pic de fluorescence à 615 nm sur les solutions d'HpD dans du PBS.

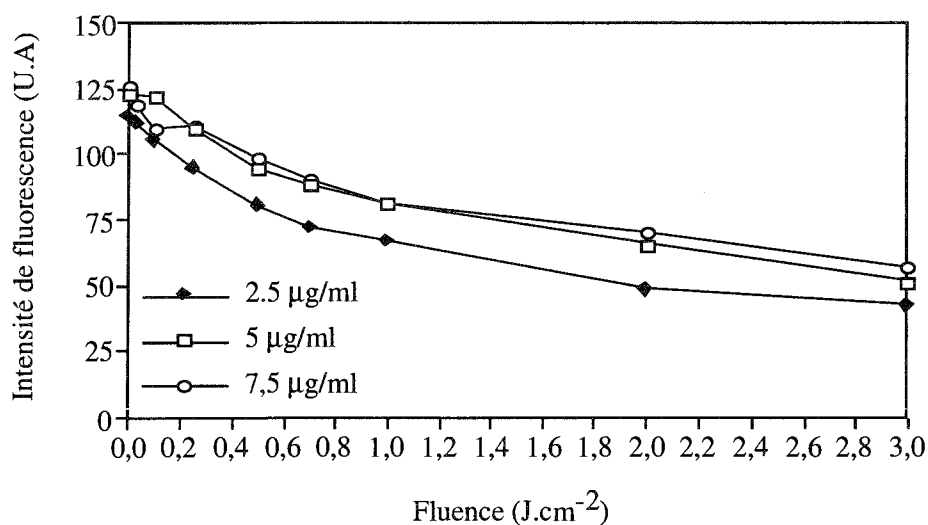


Figure X.10 : Courbe de décroissance de l'intensité du pic de fluorescence à 624 nm sur les solutions d'HpD dans du PBS supplémenté de 2% de SVF.

Tableau X.2 : Constantes de photodégradation calculées à partir de la décroissance de fluorescence des pics d'émission des solutions d'HpD à 624 nm en présence de sérum et à 615 nm en absence de sérum. Les valeurs calculées représentent la moyenne $\pm$ écart-type sur cinq essais.

HpD ($\mu\text{g/ml}$)	Constantes de photodégradation en $\text{cm}^2.\text{J}^{-1}$		
	Fluorescence (PBS)	Fluorescence (SVF)	Fluo(SVF)/Fluo(PBS)
2,5	$0,070 \pm 0,013$	$0,307 \pm 0,013$	4,39
5	$0,065 \pm 0,006$	$0,254 \pm 0,022$	3,91
7,5	$0,063 \pm 0,004$	$0,199 \pm 0,010$	3,16

La comparaison des courbes de décroissance de fluorescence dans les deux milieux démontre qu'à concentration équivalente, l'intensité de fluorescence initiale (IF) mesurée en unités arbitraires est plus prononcée dans les solutions d'HpD diluées en présence de sérum, pour 5 $\mu\text{g/ml}$ IF= 75 dans du PBS et IF= 125 en présence de SVF. En effet, la désagrégation des porphyrines associées par des liaisons non-covalentes en présence de sérum fait apparaître des espèces monomériques qui augmentent l'intensité intégrale de fluorescence (Smith, 1985 ; Poletti *et al*, 1984).

D'autre part, le phénomène d'extinction de fluorescence semble beaucoup plus rapide dans le milieu contenant du sérum et en considérant une même fluence de photoirradiation (ex : 0,5 J.cm^{-2}) et une concentration d'HpD fixe (5 $\mu\text{g/ml}$), nous pouvons observer que la décroissance de la fluorescence initiale en présence de sérum est de 23% comparée à 8% obtenue dans les solutions d'HpD dans du PBS. Ce phénomène est par ailleurs mis en évidence par le calcul des constantes de décroissance de fluorescence qui semblent être 3 à 4 fois plus élevées en présence de sérum (tableau X.2).

Pourquoi le phénomène de photodégradation est-il plus prononcé en présence de sérum dans le milieu?

La présence de SVF dans les solutions d'HpD nous permet d'assimiler ce microenvironnement à un milieu biologique. Dans un tel système, plusieurs biomolécules photo-oxydables peuvent interagir avec les porphyrines et modifier le mécanisme et le rendement de photoblanchiment.

Nos résultats sont en accord avec les données de la littérature (Richard *et al*, 1983 ; Roberts *et al*, 1989 ; Bezdetnaya *et al*, 1994) qui rapportent l'influence de l'albumine sérique humaine ou du sérum de veau fœtal sur l'augmentation du taux de photodégradation des porphyrines.

Dans le processus de photoblanchiment, la première étape consiste en un transfert d'énergie de l'état triplet des porphyrines à l'oxygène moléculaire et la production de l'oxygène singulet. Dans un milieu aqueux simple, cas du PBS, le processus de photo-oxydation consiste en l'attaque directe des porphyrines par $^1\text{O}_2$ (réaction de type II). En revanche, dans les milieux plus complexes (en présence de SVF), les substrats potentiellement photooxydables sont convertis en présence d' $^1\text{O}_2$ en oxydants puissants capables à leur tour de réoxyder les molécules de porphyrines (réaction de type I). Aux vues des résultats obtenus, il semblerait que les protéines sériques interviennent lors du processus de photoblanchiment et que la voie préférentielle de photodégradation soit la réaction de type I. En effet, étant donné que les constantes de photodégradation sont plus élevées dans le milieu avec sérum (tableaux X.1 et X.2) que dans le milieu aqueux (PBS) où l'absence de substrats photooxydables exclut la possibilité de réaction de type I, nous pouvons conclure que l'accélération de la photodégradation est la conséquence de la contribution des réactions radicalaires dans le processus de type I.

Cette prédominance de la réaction de type I pourrait également être expliquée par la différence de la nature chimique des porphyrines dans les deux différents milieux. En présence de SVF, le spectre d'absorption (figure X.5, spectre 2) révèle par l'allure de la bande de Soret, la coexistence de différentes espèces moléculaires dont l'activité photochimique a été démontrée par le spectre d'excitation de fluorescence alors que dans le milieu aqueux (PBS) seules les espèces monomériques sont potentiellement actives (figure X.7). Selon l'espèce chimique considérée, la nature des réactions photochimiques impliquées est très différente. Les polymères empruntent préférentiellement un processus photodynamique de type I alors que dans le même système, les monomères et les dimères réagissent principalement selon des réactions de type II (Grossweiner, 1982). Ainsi, dans le milieu sans sérum le processus photochimique le plus dominant serait la réaction de type II (via l'oxygène singulet) alors qu'en présence de sérum les deux processus pourraient interagir avec une prédominance pour les réactions de type I.

3-3-Evaluation de la photodégradation de l'HpD par essais de cytotoxicité

La photodégradation sera évaluée par comparaison de l'effet de photoinactivation cellulaire obtenu avec la solution témoin à celui obtenu avec les solutions pré-irradiées.

La figure X.11 démontre l'effet typique de décroissance de la cytotoxicité des cellules mises en contact avec des solutions d'HpD préalablement exposées à la lumière bleue (fluences comprises entre 0,01 et 7 J.cm⁻²). L'évolution de l'altération de l'activité photodynamique révèle un effet de photodégradation de l'HpD. Pour illustrer ce phénomène, nous avons déterminé une donnée supplémentaire : «la concentration active d'HpD». Cette donnée correspond à la quantité d'HpD réellement présente dans le milieu après photoirradiation.

Elle est évaluée à partir de la courbe de cytotoxicité obtenue avec les solutions d'HpD photoirradiées et d'une courbe de calibration obtenue dans les mêmes conditions mais avec des solutions témoins non-photoirradiées (figure X.12, courbe de calibration). A chaque niveau de cytotoxicité correspond une concentration d'HpD donnée qui est extrapolée à partir de la courbe de calibration. Ces concentrations appelées «concentrations actives» sont représentées en fonction des fluences de préirradiation de l'HpD (figure X.13). La photodégradation de l'HpD est ainsi exprimée par rapport à la décroissance de la concentration d'HpD active dans le milieu d'incubation après photoirradiation des solutions.

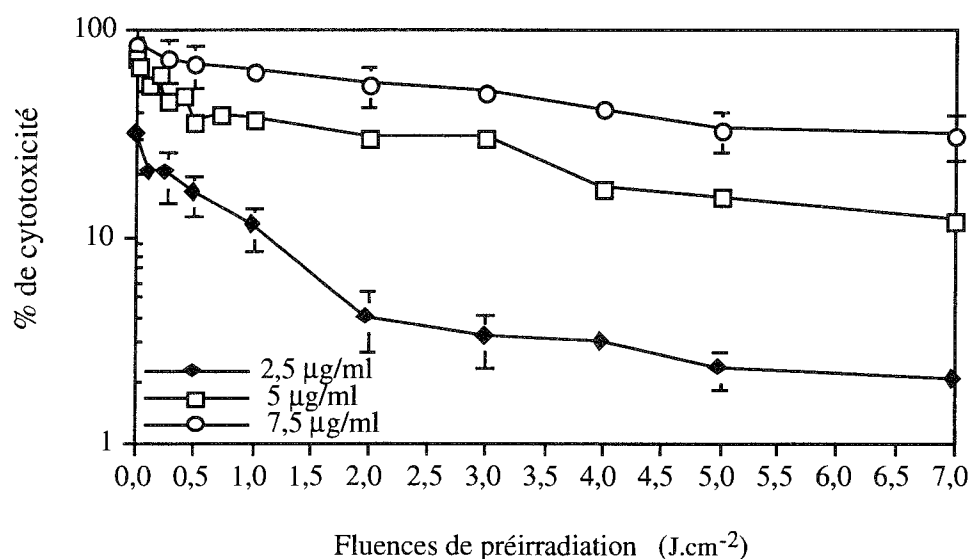


Figure X.11 : Courbes de décroissance du pouvoir de photoinactivation des cellules HT29 à une fluence de 0,5 J.cm⁻², en fonction des fluences de préirradiation des solutions d'HpD.

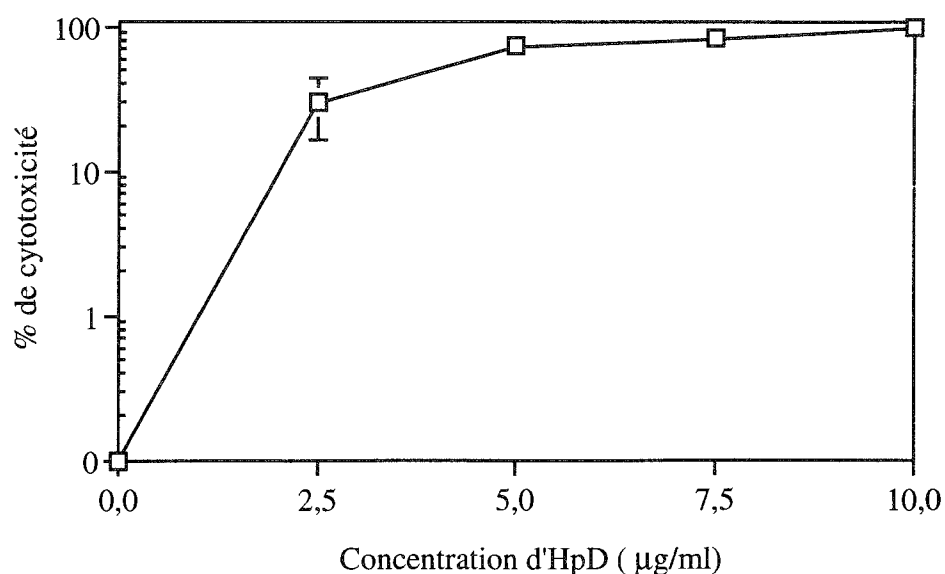


Figure X.12 : Courbe de cytotoxicité des cellules HT29 exposées à la lumière bleue ($\lambda < 415$ nm) à une fluence de $0,5 \text{ J.cm}^{-2}$ en fonction de la concentration en HpD (courbe de calibration).

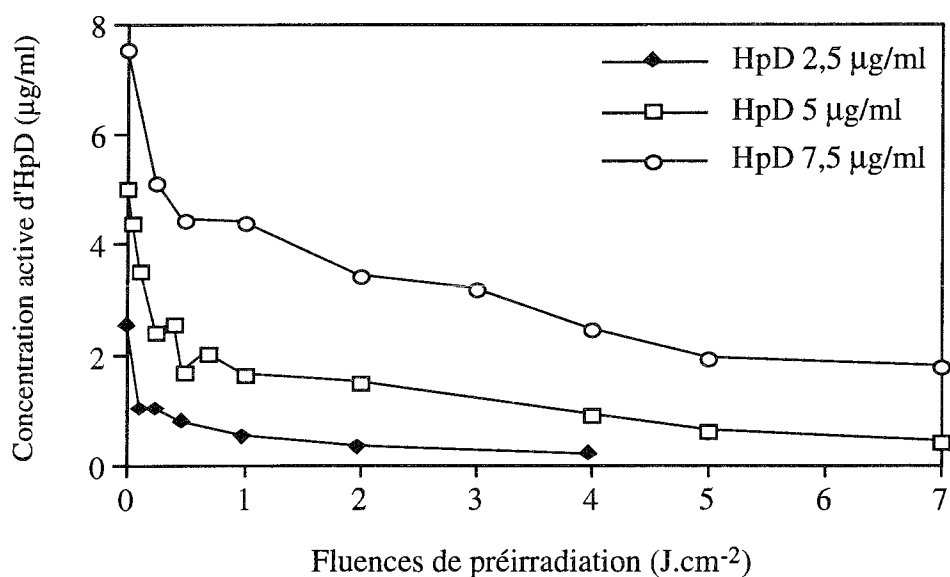


Figure X.13 : Courbe de décroissance des concentrations actives d'HpD dans le milieu d'incubation après photoirradiation des solutions à différentes fluences en lumière bleue ($\lambda < 415$ nm).

À partir de la représentation semi-logarithmique de la concentration active d'HpD en fonction des fluences (figure X.14), nous avons déterminé les pentes initiales correspondant aux constantes de photodégradation (tableau X.3).

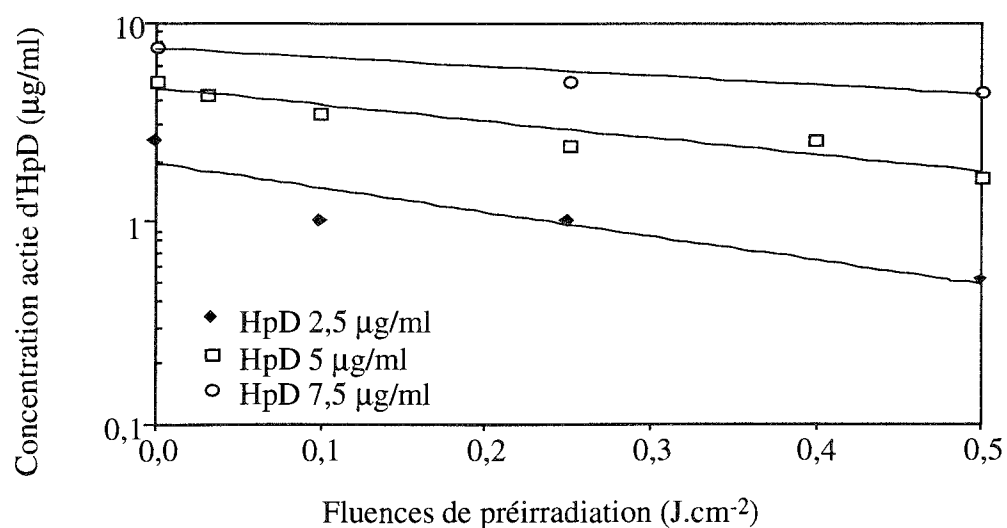


Figure X.14 : Courbe semi logarithmique de la décroissance de la concentration active dans le milieu en fonction des fluences de préirradiation.

Tableau X.3 : Constantes de photodégradation de l'HpD évaluées à partir de la décroissance du pouvoir de photoinactivation des cellules.

HpD (µg/ml)	Constantes de photodégradation de l'HpD (cm ² .J ⁻¹)
2,5	2,8±0,3
5	2,0 ±0,6
7,5	1,0 ±0,1

L'analyse comparative des cinétiques de photoblanchiment de l'HpD dans une solution aqueuse supplémentée de 2% de SVF par les méthodes spectrométriques et par le test biologique de cytotoxicité au MTT démontre que le taux de photodégradation le plus élevé est obtenu avec cette dernière méthode qui mesure plus particulièrement les

conséquences biologiques de la photodégradation. La fluorescence explore moins précisément les qualités photochimiques des solutions d'HpD irradiées.

Si nous comparons dans les mêmes conditions de photoirradiation le taux de photoblanchiment évalué à partir de la décroissance de fluorescence à celui obtenu à partir de la décroissance d'absorption au niveau de la bande de Soret, nous observons une différence de l'ordre d'un facteur 10 entre les deux méthodes. Cette différence revient au fait que chacune des deux méthodes analyse plus ou moins spécifiquement un composé chimique donné de l'HpD. En effet, le rendement de fluorescence des monomères est beaucoup plus élevé que celui des agrégats dont les états excités singulets sont rapidement «quenchés» (Smith, 1985), cette propriété photochimique les rend plus photodégradables que les formes agrégées. Ainsi, le taux de photoblanchiment évalué par la méthode de fluorescence prend plus particulièrement en compte la photodégradation des formes monomériques. En revanche l'absorption au niveau de la bande de Soret est principalement due aux formes agrégées qui sont photochimiquement plus stables et dont la photodégradation évolue beaucoup plus lentement que celle des formes monomériques.

En conclusion, nous pensons que l'évaluation du taux de photodégradation de l'HpD par ces deux méthodes spectrométriques sous-estime les conséquences réelles de la photodégradation de l'HpD dans le milieu biologique. Notre approche expérimentale est à notre avis celle qui rend le mieux compte des effets de la photodestruction du composé et ce d'autant que l'étude a une finalité clinique.

3-4-Visualisation de la photodégradation de l'HpD intracellulaire par microscopie de fluorescence et analyse d'images

La technique utilisée dans cette partie de notre étude est en étape de développement préliminaire. Elle permet l'accès à différents niveaux d'information concernant le comportement du phénomène de photodégradation au niveau cellulaire et subcellulaire, mais ne permet en aucun cas de le quantifier.

3-4-1-Visualisation de la distribution intracellulaire de l'HpD

Sur la figure X.15, nous observons 16 images de fluorescence recueillies pendant 60 secondes sur une cellule HT29 photoirradiée par une lumière bleue ($\lambda < 480$ nm) à

travers l'objectif du microscope. L'émission de fluorescence est recueillie à travers un filtre passe bande centré sur 630 nm.

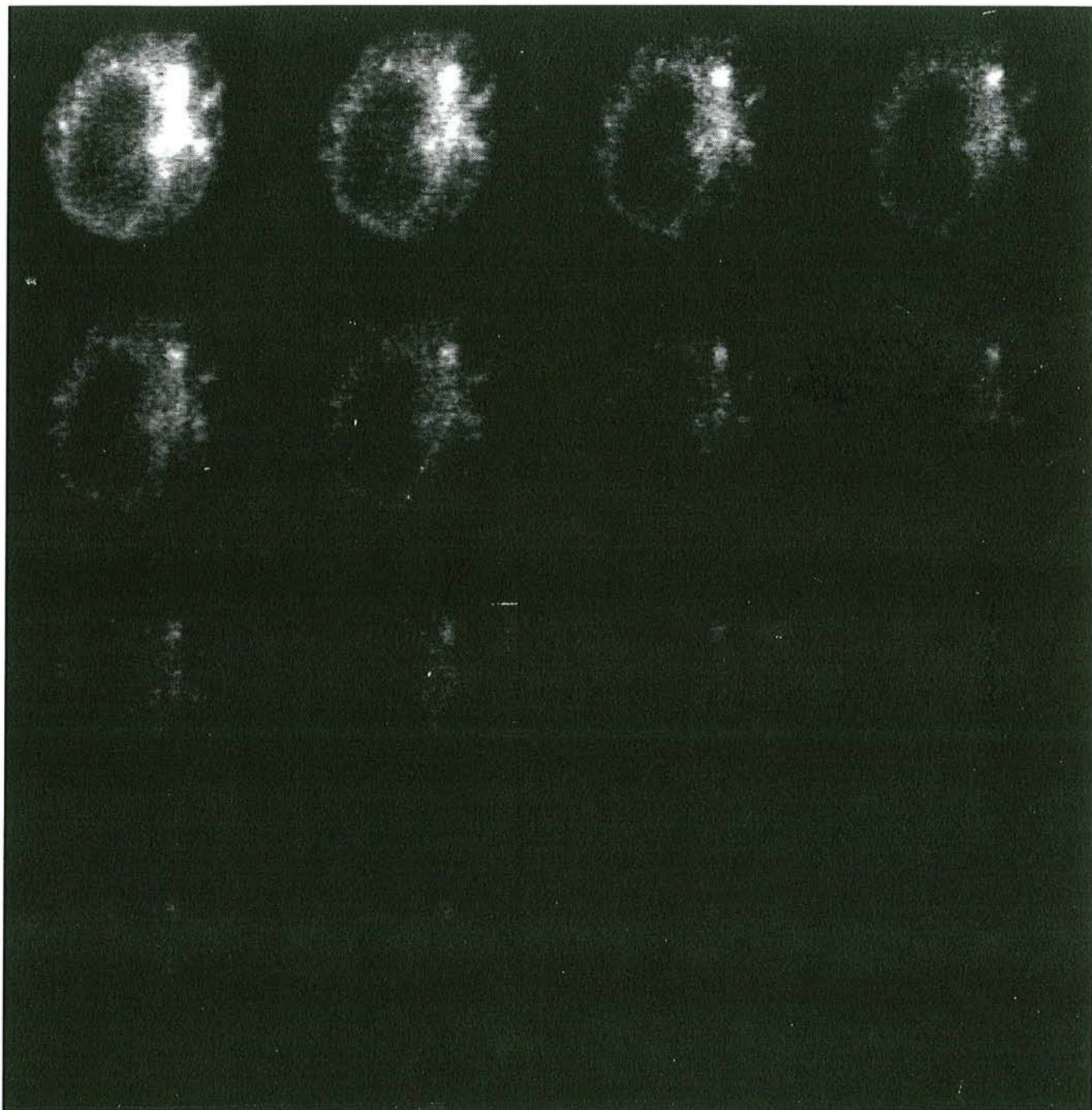


Figure X.15 : Images de fluorescence recueillies pendant 60 secondes. La cellule HT29 est photoirradiée par une lumière bleue ($\lambda < 480$ nm) à travers l'objectif du microscope. L'émission de fluorescence est recueillie à travers un filtre passe bande centré sur 630 nm.

A partir des images représentées figure X.15, à l'aide du logiciel NIH-Image (National Institute of Health, Bethesda, MD) nous avons étudié les variations d'intensité lumineuse (en niveaux de gris) sur une ligne horizontale traversant chaque image.

Les niveaux de gris évoluent de 0 à 256 (0 pour le niveau maximal de fluorescence et 256 en absence totale de fluorescence). La distribution initiale de l'HpD intracellulaire après une durée d'incubation de 18 heures est obtenue à partir de la première image de fluorescence de la cellule qui correspond au temps zéro de l'acquisition des données. La répartition topographique intracellulaire est estimée à partir des niveaux de gris (figure X.16).

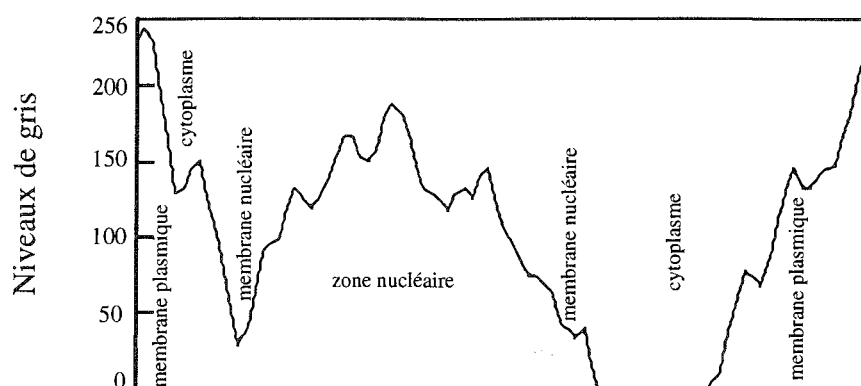


Figure X.16 : Distribution topographique de l'intensité de fluorescence en niveaux de gris, dans les différentes zones intracellulaires sur une cellule HT29 incubée à 50 µg/ml d'HpD pendant 18 heures.

La plus forte concentration d'HpD est observée au niveau du cytoplasme où le niveau zéro est atteint. Nous observons également une concentration d'HpD relativement élevée au niveau de la membrane nucléaire avec une valeur de 41 en niveaux de gris et une concentration moins importante au niveau de la membrane cytoplasmique avec des valeurs respectives de 138 et 133.

La détermination de l'intensité de fluorescence au niveau du noyau est en revanche plus difficile en raison des variations observées sur le diamètre du noyau entre 51 et 195.

Ainsi, l'HpD intracellulaire semble se localiser dans les différentes zones intracellulaires selon l'ordre décroissant suivant : cytoplasme, membrane nucléaire, noyau, membrane cytoplasmique.

Cette forte concentration au niveau du cytoplasme, pourrait être expliquée par le fait qu'au cours des temps d'incubation relativement longs (18 h), les porphyrines migrent

de la membrane plasmique vers la zone nucléaire et les sites adjacents comme les mitochondries et d'autres organites intracellulaires (Schneckenburger, 1988).

3-4-2-Visualisation de phénomène d'extinction de fluorescence

Par ailleurs, nous avons représenté figure X.17, le profil type de l'évolution de la fluorescence intégrale enregistrée sur une cellule isolée pendant une durée de 40 secondes d'exposition à la lumière du microscope ($\lambda < 480$ nm).

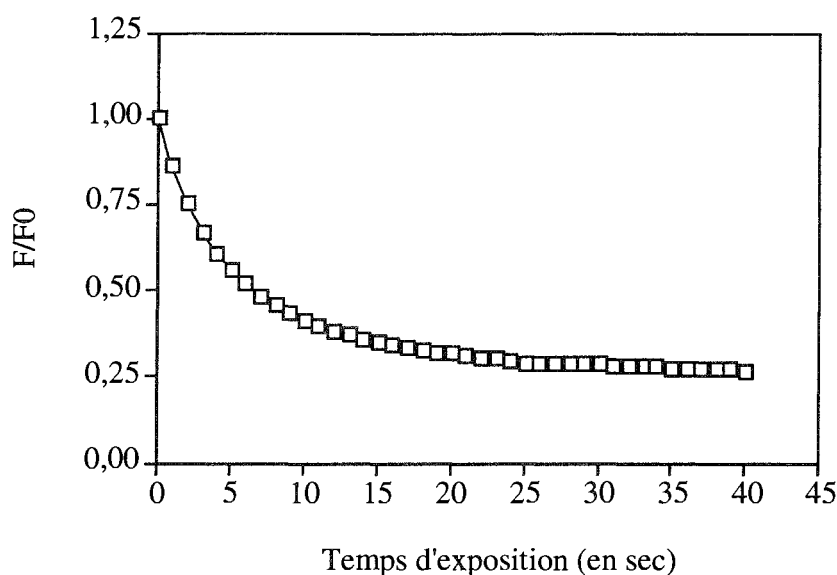


Figure X.17 : Cinétique de photoblanchiment de l'HpD à partir d'images de fluorescence recueillies pendant 40 secondes sur une cellule HT29 isolée. L'intensité de fluorescence est exprimée en valeurs normalisées en rapportant l'intensité de fluorescence de chaque image (F) à l'intensité de fluorescence initiale (F_0) relevée au début de l'acquisition.

Les valeurs moyennes d'intensité de fluorescence recueillies à un temps donné (F) sont normalisées par rapport à l'intensité de fluorescence initiale de la cellule (F_0). L'expression du rapport F/F_0 en fonction du temps d'exposition à la lumière permet d'illustrer la cinétique de décroissance de la fluorescence intracellulaire. L'observation de la cinétique de photodégradation (figure X.17) démontre une phase de décroissance exponentielle rapide sur la partie initiale de la courbe (jusqu'à 10 secondes), une phase plus lente entre 10 et 20 secondes et un plateau de valeurs constantes entre 20 et 40 secondes. La représentation logarithmique de la courbe de cinétique de photodégradation sur la partie initiale comprise entre 0 et 20 secondes (figure X.18)

révèle une allure bi-exponentielle de la cinétique de photoblanchiment ce qui est en parfait accord avec nos essais de cytométrie en flux (chapitre IX, 3-2). Sur chaque partie exponentielle de la courbe une constante k a été évaluée, elle correspond à la pente de décroissance de fluorescence sur chaque mono-exponentielle, k_1 correspond à la constante calculée pour un temps d'exposition inférieur à 10 secondes et k_2 à la constante calculée pour un temps d'exposition compris entre 10 et 20 secondes, elles sont exprimées en seconde⁻¹.

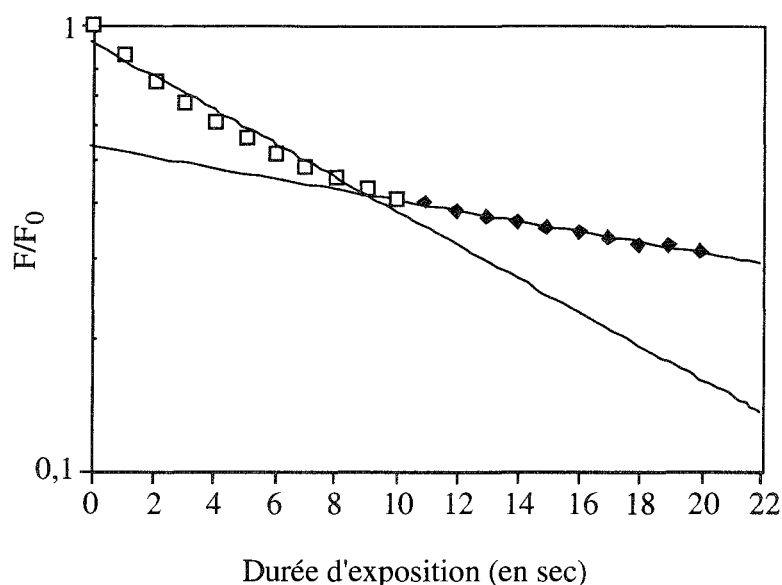


Figure X.18 : Représentation logarithmique de la cinétique de photoblanchiment de l'HpD sur la partie initiale de décroissance exponentielle (de 0 à 20 secondes).

Tableau X.4 : Constantes d'extinction de la fluorescence intracellulaire calculées sur huit cellules HT29 isolées.

Constantes (sec ⁻¹)	Cellules HT29 isolées								Moyenne
	1	2	3	4	5	6	7	8	
k_1	0,085	0,085	0,071	0,069	0,046	0,078	0,064	0,057	0,069± 0,005
k_2	0,027	0,027	0,025	0,018	0,016	0,025	0,018	0,011	0,021±0,002

Sur le tableau X.4, nous avons représenté les constantes d'extinction de fluorescence de chaque mono-exponentielle obtenues sur huit cellules HT29 isolées. L'observation des valeurs moyennes démontrent que la constante k_1 est en moyenne 3 fois supérieure à k_2 . Ces résultats sont en accord avec nos propres données obtenues en cytométrie en flux où la constante k_2 est en moyenne 2 fois supérieure à k_1 .

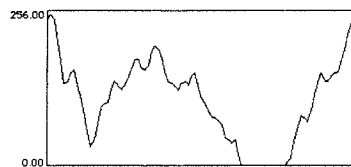


image n° 1

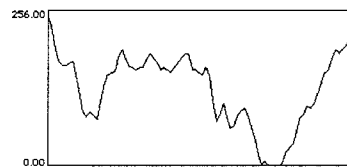


image n° 2

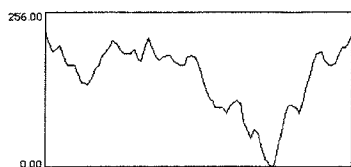


image n° 3

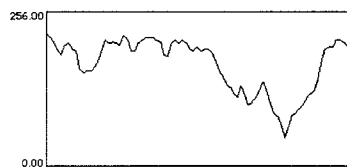


image n° 4

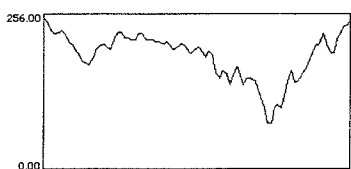


image n° 5

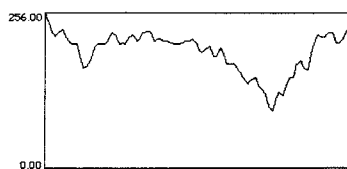


image n° 6

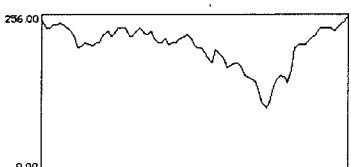


image n° 7

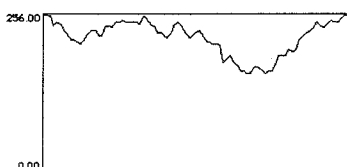


image n° 8

Figure X.19 : Distribution topographique de l'intensité de fluorescence en niveaux de gris obtenues sur les images de fluorescence intracellulaire après exposition à la lumière.

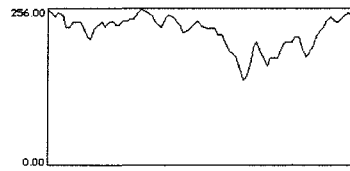


image n° 9

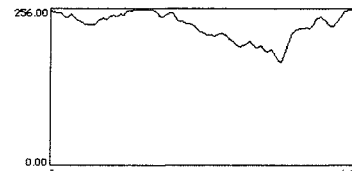


image n° 10

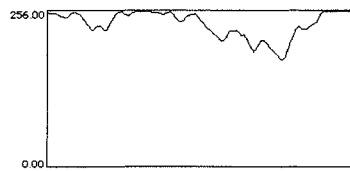


image n° 11

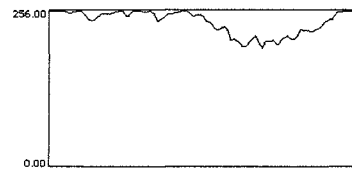


image n° 12

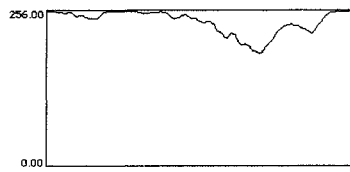


image n° 13

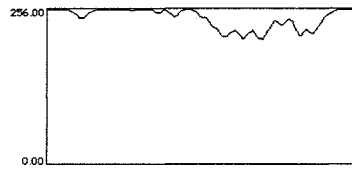


image n° 14

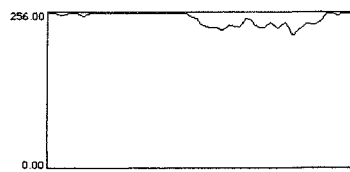


image n° 15

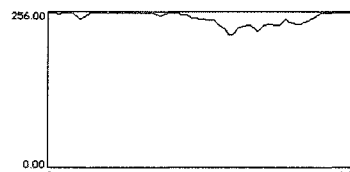


image n° 16

Figure X.19 (bis): Distribution topographique de l'intensité de fluorescence en niveaux de gris sur les images de fluorescence intracellulaire obtenues après exposition à la lumière.

Les données de la littérature rapportées par Rück (1988) démontrent par ailleurs que selon le photosensibilisateur étudié le facteur de différence entre k_1 et k_2 peut varier d'environ 5 à 10 avec une valeur toujours plus importante pour k_1 . Cette allure bi-exponentielle peut refléter par ailleurs l'existence de différentes cinétiques de photodégradation selon les sites subcellulaire et en fonction du microenvironnement chimique (Schneckenburger 1988, Rück 1990).

Les figures X.19 et X.19 bis correspondent à la répartition des niveaux de gris calculés de l'image n°1 (temps zéro de l'acquisition des données) à l'image n° 16 (après 40 secondes d'exposition à la lumière) sur une ligne horizontale traversant chaque image au même niveau. Ces figures illustrent l'évolution de l'extinction de la fluorescence intracellulaire de l'HpD sur une durée de 40 secondes. À partir de ces histogrammes et considérant qu'ils ont été enregistrés sur une ligne horizontale de l'image, nous pouvons exploiter cette technique pour analyser la cinétique d'évolution de la fluorescence de l'HpD dans chaque zone de la cellule. Sur l'exemple représenté (figures X.19 et X.19 bis) les valeurs de constantes de photodégradation ont été calculées sur une surface constante dans chaque zone cellulaire par rapport à l'évolution des niveaux de gris. Les valeurs obtenues sont de 0,031 pour la membrane plasmique, 0,050 pour la membrane nucléaire, 0,044 pour le noyau et 0,026 pour le cytoplasme. Cette différence de valeurs entre les compartiments intracellulaires, fournit un aperçu de l'influence du microenvironnement sur la photodégradation de l'HpD. Il faut néanmoins rester très prudents quant à l'aspect quantitatif de cette technique.

La différence d'extinction de fluorescence peut être due à la différence de répartition intracellulaire des différentes espèces chimiques constituant l'HpD. En effet, les monomères sont connus pour être plus spécifiquement retenus par la membrane plasmique et le cytoplasme alors que les polymères sont localisés au niveau de la zone nucléaire et périnucléaire (Scheckenburger, 1988). Ces différentes espèces chimiques ont des rendements de fluorescence très différents ce qui reflète la différence de durée de vie de leurs états excités ainsi que leur rendement de photodégradation. L'extinction de fluorescence serait ainsi nettement plus prononcée pour les monomères que pour les dimères et oligomères. Ceci est une première explication à cette différence de cinétique. Néanmoins, le photoblanchiment étant un phénomène très dépendant du microenvironnement chimique, ceci laisse par ailleurs supposer que la même molécule pourrait être dégradée plus ou moins rapidement selon la composition en protéines et lipides du milieu environnant (Moan, 1988). Hormis ces deux facteurs, le phénomène de photoblanchiment étant dépendant de l'oxygène, cette différence de cinétique pourrait également être attribuée à la différence d'approvisionnement en oxygène au

niveau des différents sites de liaison des porphyrines intracellulaires (Krieg et Whitten, 1984).

4-Conclusion et perspectives

Le premier objectif de ce travail, était de démontrer l'influence du microenvironnement biologique sur le photoblanchiment de l'HpD. La présence de SVF dans les solutions d'HpD nous a permis de travailler dans des conditions assimilables au milieu biologique.

Nous avons d'abord voulu montrer l'influence d'un système biologique sur la modification des propriétés chimiques et spectroscopiques de l'HpD. Le rôle des protéines plasmatiques dans la désagrégation des espèces oligomériques et dans le changement des taux relatifs des différentes espèces moléculaires constituant l'HpD a ainsi été mis en évidence. Ainsi, il paraît important dans les phénomènes de photoblanchiment de définir la nature du microenvironnement car une modeste modification peut induire des variations spectroscopiques importantes que l'on pourrait attribuer à une attaque du macrocycle tétrapyrrolique mais qui en réalité n'a aucune relation avec la photodégradation des molécules.

De plus, dans un tel système, en raison de la présence de plusieurs biomolécules photo-oxydables pouvant interagir avec les porphyrines le mécanisme et les rendements de photoblanchiment peuvent être modifiés. En présence de protéines sériques le rendement de photoblanchiment est plus élevé et le processus de photodégradation semble emprunter préférentiellement la réaction de type I.

Au vu de ces données on peut s'attendre à ce que les processus photochimiques et photophysiques soient encore plus complexes dans le milieu intracellulaire. Par la technique de microscopie de fluorescence et analyse d'image, nous avons démontré par évaluation des niveaux de gris dans les différents compartiments intracellulaires, la différence de fluorescence de l'HpD au niveaux des différents sites intracellulaires ainsi qu'une cinétique d'extinction d'allure exponentielle bimodale qui témoigne de l'existence de différents ordres de cinétique de photoblanchiment dans la cellule.

La diversité des facteurs physico-chimiques pouvant influencer les phénomènes photochimiques, la complexité chimique d'un composé comme l'HpD ainsi que l'hétérogénéité des micro-environnements subcellulaires contribuent à la difficulté d'étude du photoblanchiment dans le milieu biologique or le photoblanchiment est un témoin de la réaction photochimique et indirectement de la phototoxicité cellulaire.

En perspective, nous pourrions envisager après calibration de l'appareillage d'étudier plus précisément la localisation du photosensibilisateur dans les différents compartiments subcellulaires par multimarquage de fluorescence (sondes spécifiques, anticorps monoclonaux), de suivre la cinétique de photoblanchiment du photosensibilisateur dans chaque compartiment et enfin d'évaluer ainsi l'influence du microenvironnement sur le taux de photodégradation.

Expérimentation animale

CHAPITRE XI

DÉTERMINATION DES CONSTANTES DE PHOTODÉGRADATION DE L'HPD SUR TUMEURS HT29 PHOTOIRRADIÉES. ANALYSE COMPARATIVE DES TAUX DE PHOTODÉGRADATION OBTENUS AVEC DEUX LONGUEURS D'ONDE DE PHOTOIRRADIATIONS DIFFÉRENTES (413 ET 630 NM)

1-Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons démontré que l'évaluation du taux de photodégradation de l'HpD par les méthodes spectrométriques basées sur la réduction de l'absorption ou de la diminution de l'intensité de fluorescence, sous-estimait les conséquences réelles de ce phénomène en milieu biologique. Nous avons voulu dans une première partie de cette étude, réaliser *in vivo* une analyse similaire en comparant les constantes de photodégradation obtenues par deux procédés différents : la diminution de la fluorescence des tumeurs et la diminution des quantités d'HpD extraites des tissus après photoirradiation.

Sachant que des relations linéaires relient la quantité d'HpD injectée aux souris à la fluorescence des tumeurs et aux quantités extraites des tissus, le phénomène de photodégradation *in vivo* peut être mis en évidence par l'étude de ces deux paramètres (Mang, 1987).

Sur une surface tissulaire illuminée uniformément avec une dose de lumière J_0 , la fluorescence (F_0) ainsi que la concentration d'HpD (C_0) dans les tissus au début de l'exposition diminuent en fonction des doses de lumière selon une cinétique exponentielle pour atteindre respectivement $F(J_0)$ et $C(J_0)$

$$F(J_0) = F_0 \exp(-\beta_1 J_0)$$

$$C(J_0) = C_0 \exp(-\beta_2 J_0)$$

β_1 et β_2 correspondent aux constantes de photodégradation du photosensibilisateur dans le tissu. Elle est exprimée en $\text{cm}^2 \cdot \text{J}^{-1}$ (Boyle et Potter ; 1987).

Dans une seconde partie de notre étude, sachant que la source excitatrice est une lumière bleue dont la profondeur de pénétration dans les tissus n'excède pas 0,2 mm (Van Gemert, 1985 ; Rezzoug, 1994), nous avons voulu rechercher si les phénomènes de photodégradation agissaient uniquement dans les limites de pénétration de la lumière ou

s'ils se propageaient dans l'intégrité de la tumeur. Pour cela nous avons évalué les constantes de photodégradation à différents niveaux dans l'épaisseur de la tumeur.

Le troisième volet de notre étude, comprend une analyse comparative entre les constantes de photodégradation obtenues avec une longueur d'onde peu absorbée par les tissus soit une lumière rouge $\lambda=630$ nm et une longueur d'onde fortement absorbée soit une lumière bleue $\lambda<415$ nm.

2-Matériel et méthodes

2-1- Hématoporphyrine dérivée (HpD)

Solution injectable à 5 mg/ml d'origine Australienne (Queen Elizabeth Hospital, Woodville, Australie) diluée dans du sérum physiologique NaCl 9‰ avant d'être injectée aux souris.

2-2- Modèle tumoral greffé

Le modèle choisi est l'adénocarcinome de côlon humain (HT-29) greffé sur souris athymiques (Swiss nu/nu, Iffa Credo) âgées de cinq semaines, d'un poids moyen de 25 g. Les tumeurs sont induites par injection de 8.10^6 cellules viables dans une solution de glucose à 5%. Un volume tumoral de 1cm^3 est atteint 3 semaines après injection.

2-3- Photoirradiation des tumeurs

Vingt quatre heures avant photoirradiation, les souris reçoivent par voie intrapéritonéale une dose équivalente à 10 mg/kg d'HpD. Les tumeurs sont exposées superficiellement à un spot de lumière homogène de 2 cm de diamètre.

La lumière bleue : est émise par un laser krypton (Spectra Physics 2020) délivrant la lumière à une longueur d'onde inférieure à 415 nm (deux raies principales à 407 et 413 nm). La puissance de la lumière émise est de 100 mW, l'irradiance de 32 mW.cm^{-2} et les fluences varient de 0,5 à 5 J/cm^2 .

La lumière rouge : est émise par un laser à colorant pompé par un laser argon. Le laser argon (Spectra Physics 2030) continu peut produire de 5 à 25 W. Le laser à colorant (Spectra Physics 375B) utilise le kiton-red dont la longueur d'onde d'émission est filtrée à 630 nm. L'irradiance est de 150 mW.cm^{-2} et les fluences d'irradiation varient de 50 à 250 J.cm^{-2} .

Après photoirradiation, les tumeurs sont prélevées et conservées à l'abri de la lumière dans de l'azote liquide à -180°C.

2-4- Mesure de la fluorescence tumorale par spectrométrie frontale

Le montage consiste en une fibre optique excitatrice reliée au laser krypron ($\lambda=407$ nm, 32 mW). L'extrémité réceptrice est reliée à un spectrographe de type CP 200 (Jobin Yvon, France) équipé d'un détecteur CCD refroidi à l'azote liquide. Le système est relié à un logiciel qui permet de gérer le temps d'intégration de la CCD et de restituer les données sous forme de courbes calibrées en longueurs d'ondes de 200 à 800 nm. Tous les spectres sont normalisés par rapport à la puissance rétrodiffusée à 407 nm en considérant que la puissance d'excitation est constante et que le tissu tumoral est un milieu diffusant. Le signal de fluorescence recueilli est proportionnel à la puissance absorbée et inversement proportionnel à la puissance rétrodiffusée (Guillemin 1995).

Pour éviter tout artefact d'absorption, de réflexion ou fluorescence de la surface cutanée, la tumeur sera dénudée ensuite exposée à un spot de 2 cm de lumière émise par la fibre excitatrice (Irradiance=10,2 W/cm²). Les valeurs de fluorescence sont recueillies ponctuellement toutes les 50 secondes. La constante de photodégradation est ensuite déterminée en représentant le rapport F/F_0 (fluorescence au temps t / fluorescence initiale au temps t_0) en fonction des fluences utilisées. Les constantes calculées sont exprimées en cm².J⁻¹.

2-5- Détermination des quantités d'HpD intratumorales

2-5-1- Méthode chimique d'extraction

Les porphyrines sont extraites chimiquement des tissus selon la méthode de Gervais (1983). Au moyen d'un broyeur mécanique (Ultraturax, équipé d'un axe 10), 200 mg de tissu tumoral sont désintégrés dans 1 ml d'eau distillée. A la suspension tumorale obtenue sont rajoutés dans l'ordre : 2 ml de tampon acétate de sodium (pH=3,2) et 1 ml de méthanol. Les tubes sont agités au vortex pendant quelques secondes. Ensuite sont ajoutés 2 ml de solvant d'extraction (acétate d'éthyle-méthanol 90 : 10) et environ 100 mg de NaCl. Les tubes sont agités pendant 10 min et centrifugés à 800 g pendant 5 mn. Les phases sont séparées, la phase organique est conservée et la phase aqueuse est extraite une nouvelle fois avec le solvant d'extraction. Après avoir réuni les deux extraits organiques, l'échantillon est agité pendant 5 minutes et ensuite centrifugé à 800 g. La phase organique est aspirée sous vide et l'HpD résiduelle est récupérée dans une phase acide (2 ml d'HCl

4N). La quantité d'HpD extraite est déterminée par spectrofluorimétrie. Le rendement d'extraction de cette méthode est de 80%, il est déterminé sur un échantillon auquel a été rajouté une quantité connue d'HpD.

2-5-2- Mesure de la fluorescence des extraits tumoraux

Les spectres d'émission de fluorescence sont mesurés sur un spectrofluorimètre Perkin-Elmer LS 50B. La longueur d'onde d'excitation est de 405 nm et les spectres sont enregistrés de 540 à 700 nm et traités par un logiciel (FL Data Manager) qui permet de gérer des opérations d'intégration, de soustraction et diverses autres fonctions.

2-5-3. Méthode de quantification de l'HpD intratumorale

Afin d'éliminer les modifications de fluorescence de l'HpD dues au micro-environnement chimique propre à chaque fragment tumoral, chaque échantillon tumoral constitue son propre témoin. Chaque extrait est incrémenté progressivement de quantités d'HpD connues, le spectre de fluorescence est tracé pour chaque incrément et superposé aux spectres précédents. Les intensités de fluorescence sont relevées et portées sur un graphe en fonction des quantités d'HpD ajoutées. La droite obtenue permet par extrapolation du zéro de fluorescence de déterminer la quantité x_0 d'HpD initialement présente dans l'échantillon

2-5-3-1. Correction de l'autofluorescence des tissus

La correction de l'autofluorescence des tissus repose sur le principe de calcul d'un rapport R entre l'intensité de l'autofluorescence à un point invariable du spectre (point isobestique, 568 nm) et celle à un point correspondant au pic de fluorescence majoritaire de l'HpD (600 nm).

Ce rapport R est constant, sa valeur a été déterminée sur un "pool" d'échantillons tumoraux témoins sans HpD et non hémorragiques. Ainsi, connaissant la valeur de fluorescence au point isobestique et celle de R, il est possible de déduire la contribution de l'autofluorescence au niveau du pic majoritaire sur un échantillon tumoral avec HpD.

$$R = \frac{\text{Fluorescence à un point invariable}}{\text{Fluorescence au niveau du pic majoritaire}} = 1,12$$

2-5-3-2- Exemple de quantification de l'HpD sur un échantillon tumoral

La superposition des spectres (figure XI.1) permet d'observer deux points dont la fluorescence est invariable quelque soit la quantité d'HpD ajoutée (points isobestiques). Ils se situent à 568 et 690 nm. Les intensités de fluorescence à 600 nm sont ensuite corrigées

par soustraction de la valeur de fluorescence à 568 nm / R et ensuite reportées sur une droite en fonction des quantités ajoutées (figure XI.2).

Fluorescence à 568 nm=13,5

Fluorescence initiale à 600 nm= $13,5/1,12=12,05$

La valeur 12,05 est retranchée à toutes les valeurs de fluorescence à 600 nm.

Nous observons une linéarité parfaite avec un coefficient de corrélation $R=0,999$. La droite obtenue permet par extrapolation du zéro de fluorescence de déterminer la quantité x_0 d'HpD initialement présente dans l'échantillon.

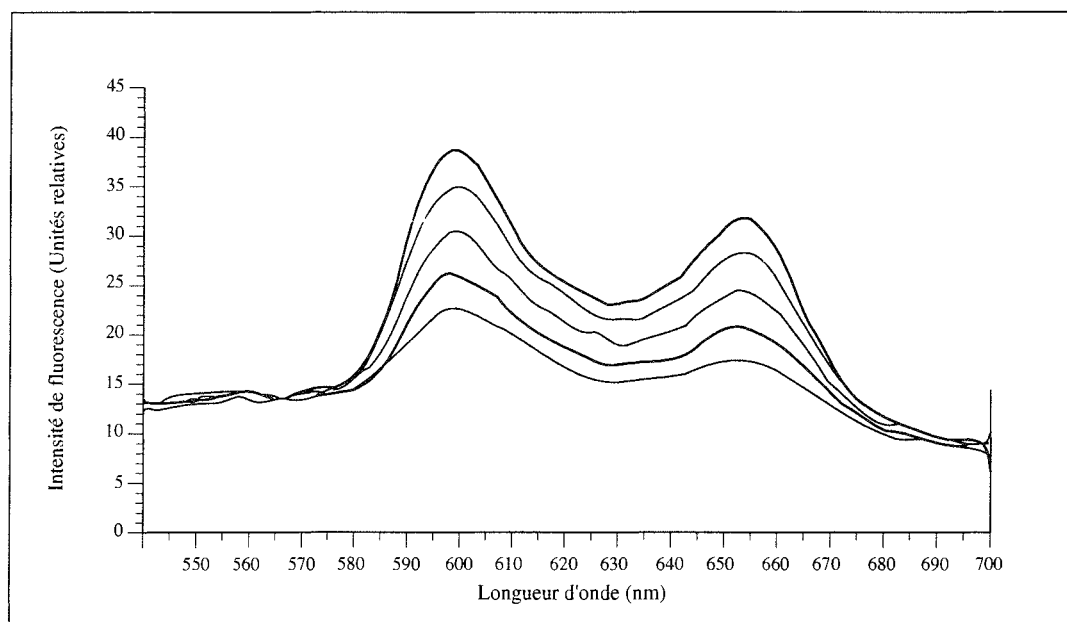


Figure XI.1 : Superposition des spectres d'émission de fluorescence de l'extrait tumoral après addition progressive d'incrémentes de $0,05 \mu\text{g}$ d'HpD et du spectre initial du même échantillon tumoral après extraction. Les points isobestiques se situent à 568 et 690 nm.

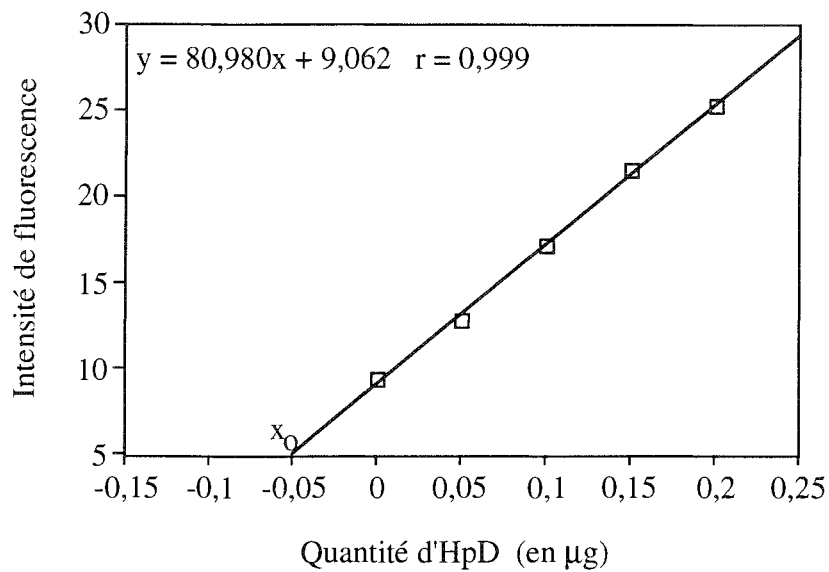


Figure XI.2 : Courbe d'évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la quantité d'HpD rajoutée.

2-5-3-3. Normalisation des résultats par rapport aux protéines tissulaires

Les quantités d'HpD extraites des tissus sont ensuite normalisées par rapport à la concentration protéique de chaque échantillon tumoral et les résultats sont exprimés en ng d'HpD/ mg de protéines.

La concentration protéique des échantillons tumoraux est dosée par la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA) dont le principe de dosage est le suivant. L'échantillon de protéines à doser est mélangé à une solution alcaline de BCA et de CuSO_4 de coloration verte, les ions Cu^{2+} sont réduits par les protéines en solution en ions Cu^+ qui forment avec le BCA un complexe coloré en pourpre. L'intensité de coloration est directement proportionnelle à la concentration en protéines dans l'échantillon et peut être lue à une longueur d'onde comprise entre 540 et 590 nm.

3-Résultats

3-1- Evaluation de la photodégradation de l'HpD intratumorale par méthode spectrométrique

3-1-1- Spectres d'émission de fluorescence sur tumeurs HT29

Les spectres d'émission de fluorescence enregistrés sur tumeurs HT29 présentent une allure générale similaire à celle des spectres enregistrés sur solutions d'HpD. Cependant, les pics majoritaires de l'émission sont décalés vers la droite, 630 nm et 695 nm au lieu de 624 et 682 nm observés sur les solutions d'HpD supplémentées de 10 % de SVF (cf chapitre X).

Ce décalage des pics vers la droite, comme nous l'avons déjà évoqué pour les solutions d'HpD supplémentées de SVF (cf chapitre X), est probablement le fait de la richesse en protéines de l'environnement tumoral qui joue un rôle dans la monomérisation des espèces agrégées et dans le changement du taux relatif des différentes espèces moléculaires composant l'HpD. Tous ces éléments ainsi que la nature hydrophobe des liaisons porphyrine-protéine induisent un décalage des bandes d'émission de fluorescence vers la droite (Korbelik et Hung, 1991).

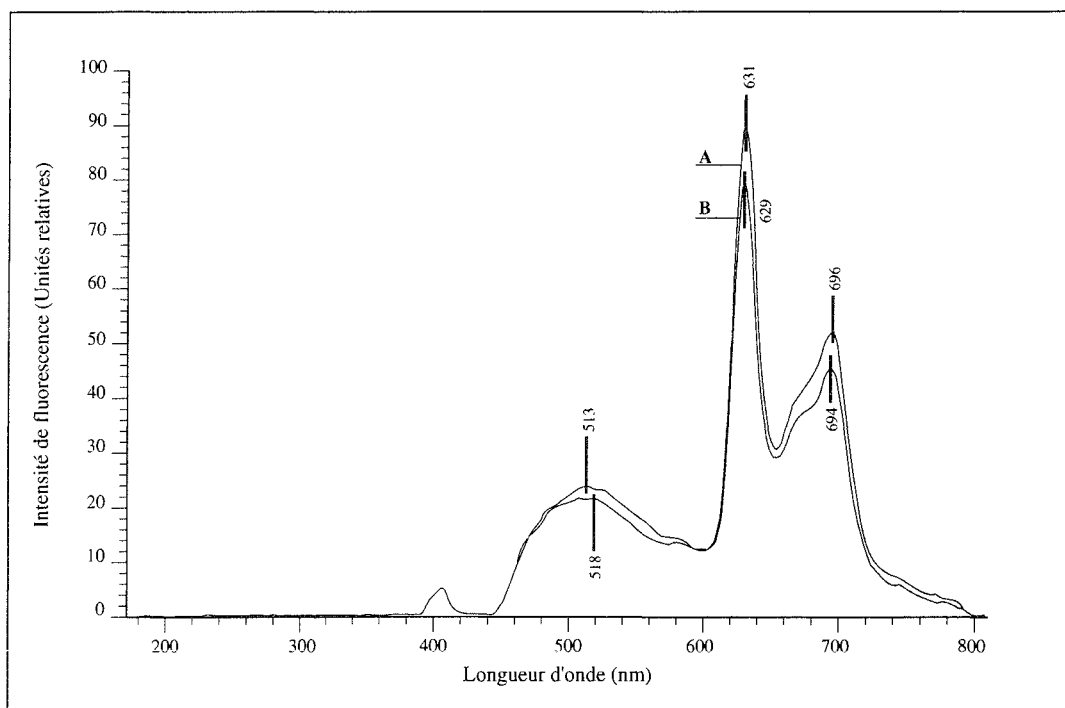


Figure XI.3 Spectres d'émission de fluorescence enregistrés sur tumeurs HT29 24 heures après injection par voie intrapéritonéale chez la souris d'une dose équivalente à 10 mg/kg. Spectre A : enregistré sur tumeur témoin non-photoirradiée, spectre B : enregistré sur tumeur photoirradiée en lumière bleue (fluence : 1J.cm^{-2}).

Comparés aux spectres obtenus sur solutions, les spectres d'émission de fluorescence enregistrés sur tumeur montrent un épaulement supplémentaire entre 660 et 680 nm qui pourrait être attribué à l'apparition de nouvelles espèces fluorescentes résultant d'un environnement chimique plus complexe. Du fait que la source d'excitation utilisée est relativement puissante (lumière bleue, $\lambda \leq 415$ nm), on ne peut exclure que les spectres considérés comme témoins aient été enregistrés après une rapide photodégradation de l'HpD et l'épaulement observé serait alors le résultat de l'apparition de nouveaux photoproduits fluorescents. Toutes les différences constatées entre les spectres de l'HpD en solution et les spectres enregistrés sur tumeur mettent en évidence une fois de plus le rôle du microenvironnement sur les propriétés physico-chimiques de l'HpD.

L'exposition des tumeurs à la lumière ($\lambda < 415$ nm, fluence 1 J.cm⁻²) induit une diminution de l'intensité des pics d'émission d'environ 12% à 630 nm et de 13 % à 394 nm. En suivant l'évolution de l'intensité de fluorescence au niveau des pics majoritaires d'émission de fluorescence nous pouvons étudier le phénomène de photodégradation de l'HpD *in vivo* sur tumeurs greffées.

3-1-2- Étude de la photodégradation de l'HpD sur tumeurs HT29 greffées

La décroissance de fluorescence de l'HpD obtenue *in vivo* sur tumeurs, est déduite de la diminution de l'intensité du pic de fluorescence à 630 nm. Les valeurs de fluorescence F relevées après exposition à une dose de lumière donnée sont normalisées par rapport à l'intensité de fluorescence initiale F_0 .

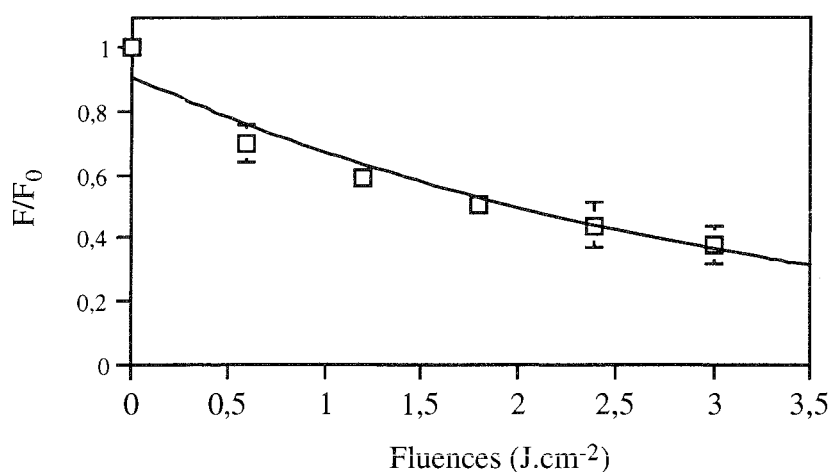


Figure XI.4 Cinétique de décroissance de la fluorescence tumorale en fonction des fluences photoirradiation en lumière bleue. Les valeurs représentent la moyenne ($\pm$ écart type) des intensités de fluorescence obtenues sur cinq tumeurs différentes.

En fonction des doses de lumière appliquées, la fluorescence initiale du tissu diminue selon une cinétique exponentielle (figure XI.4).

La constante de photoblanchiment est déduite de l'équation $F/F_0 = e^{-\beta J}$ (Mang *et al*, 1987).

F_0 = fluorescence initiale recueillie sur la tumeur non-exposée à la lumière ;

F = fluorescence après une dose de lumière d'exposition J ;

J = dose de lumière (fluence en $J.cm^{-2}$) ;

β = constante de décroissance de fluorescence.

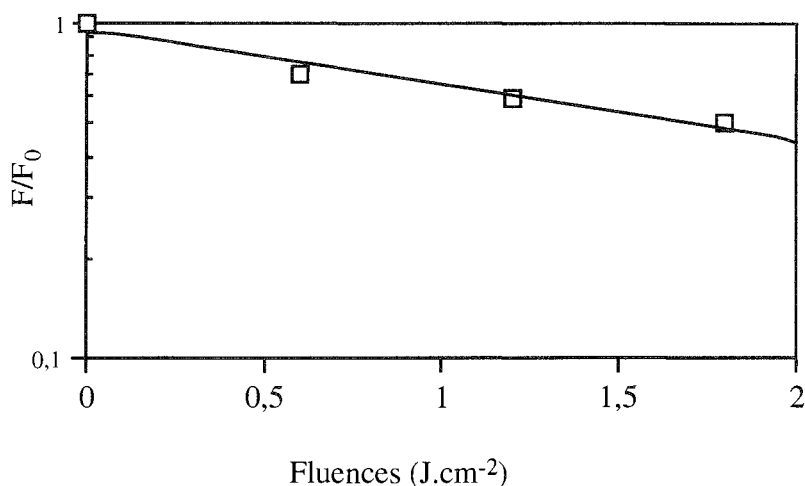


Figure XI.5 : Représentation semi-logarithmique de la décroissance exponentielle de la fluorescence intratumorale en fonction des fluences d'exposition en lumière bleue. Les valeurs représentent la moyenne ($\pm$ écart type) des intensités de fluorescence obtenues sur cinq tumeurs différentes

La pente initiale de décroissance exponentielle est calculée à partir de la représentation semi-logarithmique des valeurs de fluorescences normalisées F/F_0 en fonction des fluences (figure 6) dont l'équation de la courbe est la suivante :

$$F/F_0 = e^{(-0,375J)}$$

son coefficient de corrélation R est de 0,98 et la valeur β de la constante de photodégradation correspond à $0,375 cm^2.J^{-1}$. Cette valeur déduite de la décroissance de fluorescence des tumeurs photoirradiées en lumière bleue est du même ordre que les constantes calculées sur solutions d'HpD supplémentées de 10% de SVF et qui sont comprises entre 0,2 et $0,3 cm^2.J^{-1}$.

3-2- Evaluation de la photodégradation de l'HpD intratumorale par méthode d'extraction chimique

La photodégradation de l'HpD intratumorale a été évaluée par extraction de l'HpD par un procédé chimique après exposition des tumeurs à la lumière et par comparaison avec les quantités obtenues à celle extraite sur une tumeur témoin non-photoirradiée.

3-2-1- Validation de la méthode d'extraction

Avant d'effectuer les essais sur tumeurs photoirradiées, nous avons réalisé une série d'extractions sur des souris qui ont reçu différentes doses d'HpD (5, 10, 15 et 20 mg/kg). En admettant une relation linéaire (figure XI.6) entre la quantité d'HpD injectée aux souris et la quantité d'HpD extraite des tumeurs, ces essais ont permis de valider la technique d'extraction utilisée dans cette partie de notre étude.

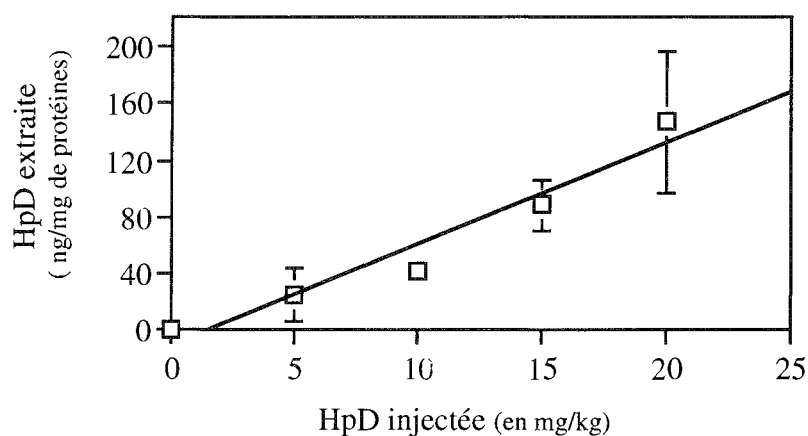


Figure XI.6 Relation linéaire entre la quantité d'HpD extraite et la quantité injectée aux souris. La tumeur est prélevée 24 heures après injection de l'HpD. Chaque point de mesure représente la moyenne des quantités extraites sur cinq tumeurs différentes réalisées en triple exemplaire.

3-2-2- Détermination de la constante de photoblanchiment après exposition des tumeurs à la lumière bleue

Les tumeurs sont exposées superficiellement à différentes fluences de lumière, elles sont immédiatement excisées et l'HpD est extraite à partir de chaque tumeur au niveau de trois échantillons différents : un échantillon supérieur prélevé à la surface de la tumeur, un

échantillon inférieur prélevé à la base de la tumeur et enfin un échantillon appelé aléatoire prélevé de manière aléatoire dans la tumeur. La cinétique de photodégradation est ensuite étudiée en représentant les quantités extraites sur les différents échantillons tumoraux en fonction des doses de lumière appliquées.

L'allure des courbes d'évolution des quantités d'HpD en fonction des fluences est similaire pour les trois types d'échantillons, la cinétique de décroissance est très rapide pour les fluences inférieures à 1 J.cm^{-2} , ensuite le phénomène est plus lent et tend vers un plateau jusqu'à 5 J.cm^{-2} (figure XI.7).

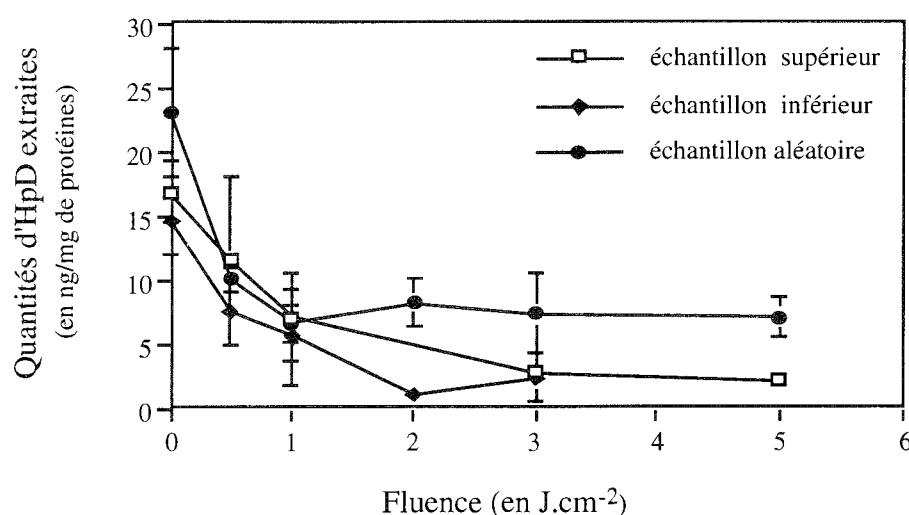


Figure XI.7 : Quantités d'HpD extraites sur différents échantillons tumoraux en fonction des doses d'exposition à la lumière bleue ($\lambda \leq 415 \text{ nm}$). Chaque point correspond à la moyenne des quantités extraites sur cinq tumeurs différentes.

Les quantités d'HpD extraites pour chaque catégorie d'échantillon, ont été comparées par analyse de variance ANOVA utilisant la procédure de Scheffé pour les comparaisons multiples (limite de confiance fixée à 95%). Aucune différence significative n'est observée entre les différents échantillons.

Pour chaque catégorie d'échantillons tumoraux, la quantité Q d'HpD extraite après une dose de photoirradiation J est normalisée par rapport à la quantité initiale Q_0 extraite sur une tumeur témoin non-photoirradiée. Les valeurs ainsi normalisées sont ensuite reportées et analysées en fonction des fluences de photoirradiation et les constantes de photoblanchiment sont calculées à partir de la décroissance exponentielle initiale (jusqu'à 2 J.cm^{-2}) de la courbe (figure XI.8) selon l'équation théorique suivante :

$$Q/Q_0 = e^{-\beta J}$$

Q_0 = quantité d'HpD initiale extraite sur une tumeur témoin non-photoirradiée ;

Q = quantité d'HpD extraite après exposition à une dose de lumière J ;

J = dose de lumière (fluence en $J.cm^{-2}$) ;

β = constante de décroissance de la quantité d'HpD présente dans les tissus.

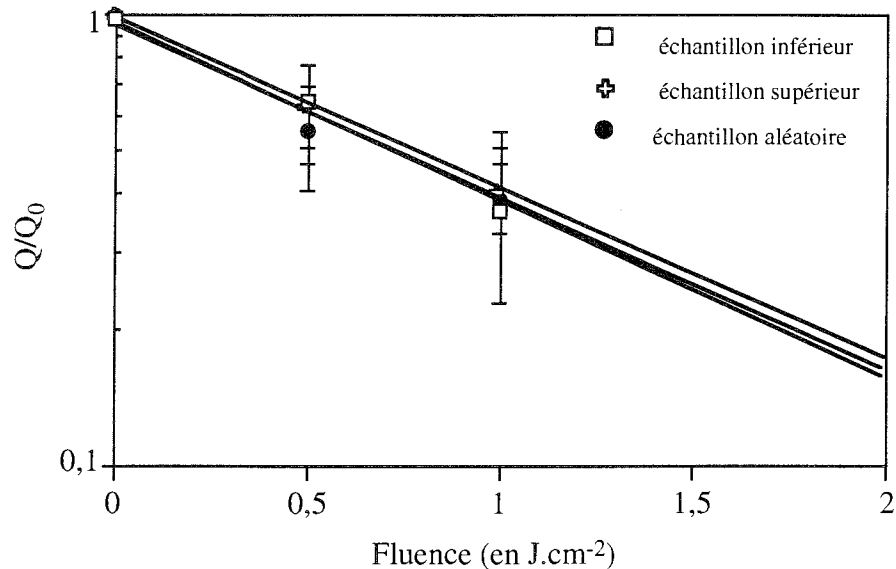


Figure XI.8 Représentation semi-logarithmique de l'évolution des quantités d'HpD extraites sur les différents échantillons tumoraux en fonction de l'exposition à la lumière bleue. Chaque point correspond à la moyenne des quantités extraites sur cinq tumeurs différentes.

Pour les trois catégories d'échantillons tumoraux, nous avons déterminé les équations des courbes de décroissance des quantités d'HpD en fonction des fluences et leurs coefficients de corrélation R :

échantillon inférieur : $y_1 = e^{-2,286J}$ $R=0,998$

échantillon supérieur : $y_2 = e^{-2,101J}$ $R=1,00$

échantillon aléatoire : $y_3 = e^{-2,162J}$ $R=0,988$

Les constantes de photodégradation correspondent aux pentes de décroissance au niveau des courbes exponentielles :

$\beta_1 = 2,286$ pour l'échantillon inférieur

$\beta_2 = 2,101$ pour l'échantillon supérieur

$\beta_3 = 2,162$ pour l'échantillon aléatoire

Compte tenu de l'absence d'une différence statistiquement significative entre les quantités d'HpD extraites sur les trois catégories d'échantillons tumoraux, nous pouvons considérer que les constantes de photodégradation obtenues à partir de ces valeurs sont les mêmes. Ces résultats montrent qu'en dépit du faible coefficient de pénétration de la lumière bleue dans la tumeur, le taux de photodégradation de l'HpD est le même indépendamment du niveau de profondeur analysé.

3-2-3 Détermination de la constante de photoblanchiment après exposition des tumeurs à la lumière rouge

Les tumeurs HT29 sont exposées à un spot de lumière rouge d'irradiance constante de 160 mW.cm^{-2} , les fluences varient de 50 à 250 J.cm^{-2} . Sachant que la lumière rouge a une profondeur de pénétration de 4 à 5 mm (Van Gemert 1985, Meunier 1991) et que l'épaisseur des tumeurs que nous avons utilisée n'excède pas 5 mm, nous pouvons considérer que dans ces conditions l'intégralité de la tumeur est exposée à la lumière et l'extraction est réalisée directement sur l'intégralité de la tumeur.

Les quantités d'HpD extraites après photoirradiation des tumeurs sont normalisées par rapport à la quantité extraite au niveau de la tumeur témoin. Les données sont représentées sous forme de Q/Q_0 en fonction des fluences de photoirradiation, elles correspondent à la moyenne des valeurs obtenues sur cinq souris différentes. Nous observons (figure XI.9) une décroissance d'allure exponentielle et la constante de photodégradation est calculée à partir d'une représentation semi-logarithmique de la partie initiale (jusqu'à 150 J.cm^{-2}) de la courbe (figure XI.10).

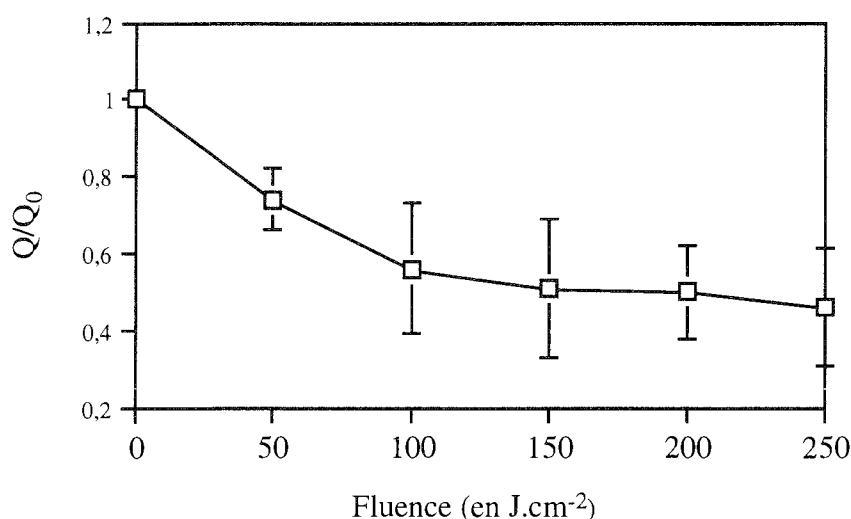


Figure XI.9 : Courbe de l'évolution des quantités d'HpD après exposition à différentes fluences en lumière rouge. Chaque point correspond à la moyenne des quantités extraites sur cinq tumeurs différentes.

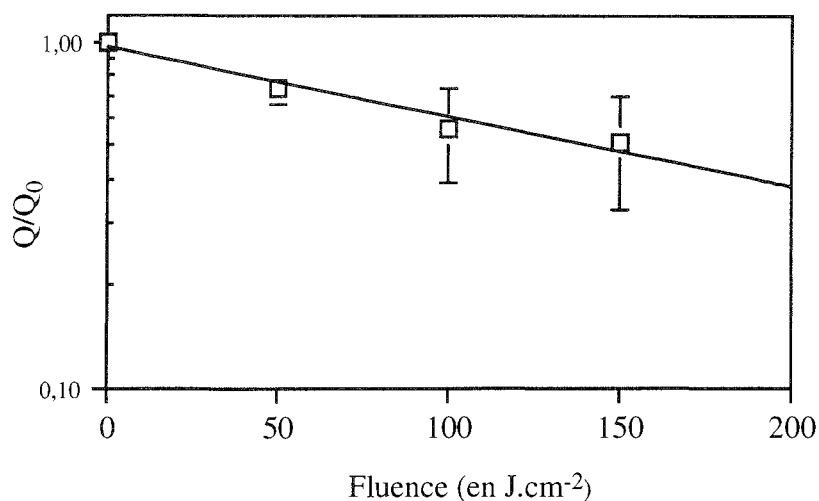


Figure XI.10 : Représentation semi-logarithmique de la courbe d'évolution des quantités d'HpD après exposition à différentes fluences en lumière rouge. Chaque point correspond à la moyenne des quantités extraites sur cinq tumeurs différentes.

L'équation de la courbe a été déterminée : $y_4 = e^{-0,046J}$

son coefficient de corrélation est $R=0,998$ et la constante de photodégradation est $\beta_4=0,046 \text{ cm}^2.\text{J}^{-1}$.

3-2-4 Comparaison des constante de photoblanchiment déterminées par spectrométrie et par méthode d'extraction chimique sur tumeurs photoirradiées en lumière bleue

Tableau XI.1 : Constantes de photodégradation calculées à partir des deux méthodes de mesure (spectrométrie et extraction chimique) pour les tumeurs photoirradiées en lumière bleue et en lumière rouge.

		Constantes de photodégradation (en $\text{cm}^2.\text{J}^{-1}$)	
		Spectrométrie	Extraction chimique
Lumière bleue	0,375		échantillon supérieur 2,101
			échantillon inférieur 2,286
			échantillon aléatoire 2,162
Lumière rouge	non déterminée		0,046

Les résultats présentés tableau XI.1 démontrent une très grande différence, environ un facteur de 6 entre la valeur obtenue par spectrométrie de fluorescence et la valeur obtenue par extraction chimique.

4-Discussion

Tableau XI.2 : Tableau récapitulatif des valeurs de constantes de photodégradation obtenues dans différents milieux : cellulaire, tumoral et aqueux. Les valeurs représentées pour les milieux cellulaires et aqueux correspondent à une constante calculée pour une concentration de 5 µg/ml. La constante de photodégradation évaluée par extraction chimique de l'HpD tumorale correspond à la moyenne des valeurs obtenues sur les trois différents échantillons tumoraux.

Constantes de photodégradation (en $\text{cm}^2 \cdot \text{J}^{-1}$)			
	Spectrométrie de fluorescence	Extraction chimique	Test de cytotoxicité
Tumeurs HT29	0,375	valeur moyenne ≈ 2,183	
Cellules HT29			2,0
solutions d'HpD (5µg/ml +2 % SVF)	0,254		

Comment justifier la différence entre les constantes déterminées par spectrométrie et par extraction chimique?

La fluorescence mesurée en surface de la tumeur dépend des propriétés optiques de la tumeur dont dépendent la pénétration de la lumière d'excitation et son émission au travers des tissus. La géométrie de la tumeur ainsi que le diamètre du spot de lumière incidente sont deux facteurs qui peuvent affecter les propriétés optiques en augmentant la diffusion de la lumière à l'intérieur du tissu. La réflexion de la fraction de lumière diffuse peut être amplifiée au contact de la limite air-tissu en raison de la différence d'indice de réfraction entre ces deux milieux, ce qui peut augmenter la valeur de l'irradiance jusqu'à un facteur de 3,5. Le rendement d'énergie en surface de la tumeur est ainsi augmenté et la profondeur de pénétration de la lumière est diminuée (Marijnissen et Star 1987, Profio et Doiron 1987, Jaques 1993)

Nous pourrions ainsi justifier la faible valeur de la constante de photodégradation enregistrée par la méthode spectrométrique par une intense réflexion de la lumière diffuse au niveau des couches superficielles de la tumeur qui compenserait la diminution de fluorescence provoquée par photoblanchiment. Si l'on admet l'hypothèse de la lumière diffuse au niveau des couches superficielles, il faut considérer que dans ces conditions la pénétration de la lumière se limite aux couches superficielles du tissu. Ainsi, quand l'HpD en surface est complètement photoblanchie, la fluorescence au niveau des couches les plus profondes du tissu persiste et ralentit la cinétique globale de photoblanchiment (Jaques, 1993).

Les résultats obtenus *in vivo* sont en accord avec ce que nous avons observé au cours des essais *in vitro* (chapitre X), les constantes de photoblanchiment déterminées sur les solutions d'HpD par diminution de l'intensité de fluorescence sont de 5 à 9 fois inférieures à celles évaluées par le test biologique.

Il est intéressant de noter que les constantes de photodégradation obtenues par spectrométrie de fluorescence dans les essais *in vivo* et dans les essais *in vitro* sont d'un ordre de grandeur comparable (respectivement 0,375 et 0,254 ; tableau XI.2) ce qui conforte l'assimilation d'un modèle de solutions d'HpD-SVF à un tissu biologique. Van Gemert *et al* (1985) avait admis cette hypothèse en assimilant le rendement relatif de la fluorescence de l'HpD dans les tissus à celui d'une solution d'HpD contenant 10% de sérum.

Comparaison des constantes de photodégradation déterminées à différents niveaux de l'épaisseur des tumeurs photoirradiées en lumière bleue ($\lambda \leq 415$ nm).

La similitude des valeurs des constantes de photoblanchiment obtenues sur les différents échantillons tumoraux à différents niveaux est difficilement interprétable (tableau XI.1). Si nous considérons que le photoblanchiment de l'HpD est un phénomène dépendant uniquement du taux d'oxygène singulet dont le seuil de production est déterminé par la longueur d'onde de photoirradiation et surtout par la profondeur de pénétration de cette lumière dans le tissu, compte tenu des données que nous avons concernant la profondeur de pénétration de la lumière bleue dans les tissus (0,1 à 0,2 mm selon J.C Van Gemert *et al* (1985) ; 0,2 et 0,4 mm selon Rezzoug *et al*, 1993), nous devrions nous attendre à ce que la constante de photoblanchiment évaluée sur la face superficielle de la tumeur, soit nettement supérieure à celles des autres échantillons prélevés en face inférieure et de manière aléatoire.

Cependant, si l'on admet que malgré sa faible pénétration dans les tissus, la lumière bleue peut engendrer des phénomènes photodynamiques radicalaires qui pourraient s'étendre dans l'intégrité tumorale, la confusion obtenue par ces résultats pourrait être levée.

En effet, plusieurs auteurs (Reyftmann 1986, Morlière *et al* 1987) ont rapporté que le photoblanchiment des porphyrines était en relation étroite avec la peroxydation photoinduite des lipides membranaires. Ces mêmes auteurs ont mis en évidence la formation d'espèces fluorescentes formées à partir de groupements amine et de malonaldéhyde provenant de lipides polyinsaturés peroxydés dont la production était parfaitement corrélée au photoblanchiment des porphyrines du milieu. Il est également très intéressant de noter que ces produits ne sont pas formés uniquement durant l'exposition à la lumière mais que le phénomène se poursuit après l'arrêt de la photoirradiation ce qui indique bien l'intervention de chaînes de réactions radicalaires (Kohen *et al*, 1984 ; Reyftmann *et al*, 1986 ; Morlière *et al*, 1987).

De plus, parallèlement aux processus photodynamiques de type I et de type II, il existe *in vivo* un troisième processus faisant intervenir des radicaux libres formés intrinsèquement dans le tissu tumoral (Gal 1992). Les porphyrines dans leur état triplet interagissent avec ces radicaux libres par un processus de transfert d'électrons qui contribuerait pour une grande part à l'ensemble du phénomène photodynamique. Le rapport de la concentration moyenne initiale des radicaux dans la tumeur sur la concentration correspondante en oxygène dans le tissu a une valeur approximative de 1 (Mosyenko et Bullach, 1974 ; Shulyakovskaya *et al*, 1993) ce qui permet de considérer que la contribution des mécanismes de type radicalaire dans le processus photodynamique global est équivalente à celle des mécanismes faisant intervenir l'oxygène (Shulyakovskaya *et al*, 1993).

Un type de processus photochimique similaire ayant été identifié comme un mécanisme de type III a été décrit par Laustriat (1986). Des conditions très spécifiques sont requises pour ce type de réaction qui ne nécessite pas l'intervention de l'oxygène. Il survient en milieu anaérobie ou dans des milieux où une concentration en réactifs (quenchers) très élevée s'oppose à l'effet de l'oxygène. Le processus qui peut se produire est le transfert de charge entre l'état triplet du photosensibilisateur (porphyrine) et l'accepteur d'électrons. L'interaction conduit à l'éjection du proton de la porphyrine anionique et à la production de trois espèces radicalaires très réactives sous des conditions anaérobies.

Nos résultats apparaissant contradictoires avec les données physiques de pénétration de la lumière bleue dans les tissus pourraient trouver une explication dans l'existence de ces processus radicalaires qui se produiraient en absence d'oxygène et qui pourraient envahir toute la tumeur.

Les tumeurs HT29 que nous avons utilisé sont très peu vascularisées, d'importantes zones de nécrose apparaissent au centre des tumeurs et témoignent d'une absence d'oxygénation. Cette donnée histologique et physiologique pourrait contribuer à conforter l'hypothèse précédente.

Afin de vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de coupler les essais avec une mesure de la pression d'oxygène dans les tissus pendant la photoirradiation ; recherche qui est cours au laboratoire du Centre Alexis Vautrin à Nancy.

Indépendamment de ces réactions radicalaires nous pouvons proposer également une hypothèse d'ordre méthodologique ou technique.

Les tumeurs sont photoirradiées superficiellement selon un faisceau cône de diamètre constant qui englobe toute la tumeur. Etant donnée la géométrie tumorale, la section transversale de la tumeur en partie supérieure et inférieure conduirait à un prélèvement de parties latérales inférieures qui seraient inévitablement photoirradiées. Ceci pourrait effectivement contribuer à modifier les concentrations d'HpD dans la couche inférieure et augmenter le taux de photodégradation, cet effet est à priori mineur.

Comparaison des constantes de photodégradations obtenues sur tumeurs photoirradiées en lumière bleue ($\lambda \leq 415$ nm) et sur tumeurs photoirradiées en lumière rouge ($\lambda = 630$ nm).

La constante de photodégradation déterminée sur les tumeurs photoirradiées en lumière rouge ($0,046 \text{ cm}^2 \cdot \text{J}^{-1}$) est de 10 fois supérieure à celle déterminée par Mang en 1987 par photométrie de fluorescence sur des tumeurs sous-cutanées de carcinome mammaire de souris. Nous observons une fois de plus que la méthode d'évaluation spectrofluorimétrique donne des valeurs inférieures à celle de la méthode d'extraction chimique. Néanmoins, il est important de tenir compte du fait que le modèle tumoral est différent et que la DHE qui est le photosensibilisateur utilisé ne correspond qu'à une fraction de l'HpD. Ces deux facteurs peuvent contribuer pour une large part à cette différence.

Par ailleurs, la méthode d'extraction chimique sur les tumeurs HT29 démontre un taux de photoblanchiment supérieur en cas de photoirradiation en lumière bleue par rapport à l'irradiation en lumière rouge. Sachant que le photoblanchiment est dépendant du nombre de quanta absorbés, ces résultats sont en accord avec le spectre d'absorption de l'HpD (Dietel, 1990 ; Profio 1984). Le taux le plus important de photoblanchiment est observé au niveau de la bande de Soret (lumière bleue, $\lambda < 415$ nm) et le taux le plus faible au niveau de la bande rouge ($\lambda = 630$ nm). Au niveau de cette bande l'absorption de l'HpD est 18 fois moins importante.

Ces résultats sont en accord avec ceux de Jaques *et al* (1993) qui a montré par mesure de la diminution de la fluorescence de tumeurs sous-cutanées chez le rat que les longueurs d'onde de lumière les moins pénétrantes au niveau des tissus induisent une cinétique de photoblanchiment plus rapide que les lumière qui pénètrent en profondeur. C'est logique car les photons bleus sont plus énergétiques que les photons rouges.

5-Conclusion et perspectives

Nous avons montré que la faible pénétration de la lumière bleue dans les tissus biologiques n'était pas un facteur limitant le processus de photodégradation au sein de la tumeur. Ceci pourrait être expliqué par l'existence de chaînes de réactions radicalaires qui pourraient s'étendre à tout le volume tumoral.

Si cette hypothèse est vraie, il est important de considérer que des réactions photodynamiques qui conduisent au photoblanchiment du photosensibilisant ne sont pas exclusives et peuvent en conséquence induire un effet photodynamique. Pour envisager cette hypothèse, il convient de suivre la régression tumorale des tumeurs photoirradiées à différentes doses de lumière bleue.

CHAPITRE XII

ÉVALUATION DE L'EFFET DE L'ASSOCIATION SÉQUENTIELLE DE DEUX PHOTOIRRADIATIONS SUR TUMEURS HT29 GREFFÉES

1-Introduction

Dans cette dernière partie de notre étude nous avons reproduit sur un modèle *in vivo* le schéma d'un protocole clinique hypothétique où un diagnostic par détection de fluorescence précéderait un traitement photodynamique.

Les essais *in vitro* présentés chapitre IX ont démontré que l'association séquentielle de deux photoirradiations avait pour conséquence le photoblanchiment de l'HpD et l'altération de l'efficacité de la PDT.

Pour valider les hypothèses établies à partir du modèle cellulaire en monocouche négligeant l'organisation tri-dimensionnelle et les propriétés physiologiques des tumeurs, un modèle *in vivo* a été développé (xénogreffe de cellules HT29 sur souris athymiques).

Nous avons choisi pour la lumière rouge une fluence de 150 J.cm^{-2} qui correspond à la dose communément utilisée dans les essais cliniques (Moan 1988). Pour la lumière bleue, nous avons sélectionnée une fluence en lumière bleue de 1 J.cm^{-2} .

Les résultats obtenus avec l'association séquentielle des deux lumières ont été comparés à ceux obtenus dans les protocoles de photoirradiations uniques en lumière rouge ou en lumière bleue. Différentes méthodes d'évaluation ont été adoptées :

- une méthode analytique : l'extraction chimique de l'HpD intratumorale ;
- une méthode physique : l'évaluation de la décroissance de fluorescence de l'HpD intratumorale;
- méthode biochimique : le dosage du malondialdéhyde (MDA), marqueur de la peroxydation des lipides membranaires qui interviennent dans le processus radicalaire ;
- une méthode d'évaluation des effets biologiques : le suivi de l'évolution du volume tumoral sur les souris traitées.

Pour chaque méthode d'évaluation, les résultats obtenus sur chaque catégorie de traitement sont analysés par des tests statistiques : analyse de variance et Mann-Whitney.

2-Matériel et méthodes

2-1-Modèle animal

Souris athymiques femelles (swiss nude) âgées d'environ cinq semaines, de poids moyen de 25 grammes et porteuses de tumeurs HT-29 d'environ 1cm^3 induites par injection de 8.10^6 cellules tumorales HT29 viables. Vingt quatre heures avant traitement, les souris reçoivent par voie intrapéritonéale une dose d'HpD équivalente à 10 mg/kg.

2-2-Photoirradiations des tumeurs

Selon la modalité de photoirradiation des tumeurs, les souris traitées sont séparées en trois groupes :

- le premier groupe est constitué de souris dont les tumeurs sont photoirradiées à la lumière bleue (1 J.cm^{-2}), il sera appelé groupe LB ;

- le second groupe est constitué de souris dont les tumeurs sont photoirradiées à la lumière rouge (150 J.cm^{-2}), il sera appelé groupe LR ;

- le troisième groupe est constitué de souris dont les tumeurs sont exposées séquentiellement à la lumière bleue puis à la lumière rouge (l'intervalle de temps séparant les deux photoirradiations est compris entre 20 et 30 minutes), il sera appelé groupe AS.

Les tumeurs sont exposées superficiellement à des spots de lumière de 2 cm de diamètre qui recouvrent toute la surface tumorale. Le choix d'un diamètre constant permet de minimiser l'erreur sur la dose de lumière délivrée à chaque souris.

Les spots de lumière sont obtenus au moyen d'une fibre optique de 600 μm de diamètre (Silica, Sedi-France) portant à son extrémité une microlentille. L'homogénéité du spot est obtenue par réglage de l'écrasement de la fibre. La puissance en sortie de fibre est contrôlée par un puissance-mètre (Newport 815).

Lumière rouge : laser à colorant ($\lambda=630\text{ nm}$) la puissance en sortie de fibre est de 500 mW, l'irradiance de 160 mW/cm^2 et la fluence totale utilisée est de 150 J/cm^2 .

Lumière bleue : laser krypton ($\lambda<415\text{ nm}$), puissance en sortie de fibre de 100 mW, irradiance constante de 32 mW/cm^2 et la fluence utilisée est de 1 J/cm^2 .

Pour les protocoles concernant les extractions chimiques d'HpD et de MDA, les tumeurs sont prélevées et immédiatement conservées à l'abri de la lumière dans de l'azote liquide.

2-3-Mesure de la température intratumorale

Pour s'assurer que l'effet de régression ou de retard de croissance tumorale est imputable à l'action photodynamique et non à un effet hyperthermique, nous avons mesuré l'évolution de la température pendant l'exposition des tumeurs à la lumière. Les mesures ont été effectuées sous la peau au contact de la tumeur toutes les 30 secondes au moyen d'un thermocouple chromel-alumel (Digisense, Bioblock, Illkirch, France) sur un nombre minimal de cinq souris.

2-4-Formule de calcul des doses de lumière équivalentes

Les doses d'énergie absorbées par un photosensibilisateur donné dépendent de son spectre d'absorption et de la longueur d'onde de la lumière excitatrice. La formule de calcul des doses d'énergie équivalentes, tient compte de la longueur d'onde de la lumière excitatrice, du temps d'exposition à cette lumière et de l'absorption du produit à cette longueur d'onde. Elle permet pour une dose de lumière délivrée à une longueur d'onde donnée λ_1 , de calculer le temps d'exposition correspondant pour obtenir la même dose d'énergie à une longueur d'onde λ_2 (équation 1).

Compte tenu de la différence des coefficients d'atténuation des deux lumières dans les tissus, une même dose de lumière incidente n'aura pas les mêmes effets dans le bleu ou dans le rouge. En utilisant la loi de Beer-Lambert, les doses de lumières incidentes seront corrigées en fonction de leur coefficient d'extinction dans les tissus, à une distance x donnée (équation 3).

$$t_1 I_1 (1-T_1) = t_2 I_2 (1-T_2) \quad (1)$$

$$T = 10^{-A} \quad (2)$$

$$I = I_0 e^{-\mu x} \quad (3)$$

t =temps d'exposition à la lumière (en secondes)

T =transmission

A =absorbance

I_0 =le flux lumineux initial (watt.cm^{-2})

I =le flux lumineux mesuré après avoir traversé une épaisseur x (watt.cm^{-2})

μ =coefficient d'atténuation global

$1/\mu$ =profondeur à laquelle 63% de la dose de lumière incidente est absorbée par le tissu

x =distance parcourue par le flux lumineux (en mm)

Pour les tumeurs HT29, les valeurs des coefficients d'extinction calculées pour la lumière rouge et la lumière bleue correspondent respectivement à $\mu_R=0,71 \text{ mm}^{-1}$ et $\mu_B=2,5 \text{ mm}^{-1}$ (Meunier 1991, Rezzoug 1992).

À une distance théorique x parcourue par le flux lumineux, les fluences théoriques sont :

$$\text{Fluence (lumière rouge)} : F_R = t_R \cdot (I_{0R} e^{-\mu_R x}).$$

$$\text{Fluence (lumière bleue)} : F_B = t_B \cdot (I_{0B} e^{-\mu_B x}).$$

Pour une fluence F_B en lumière bleue, sa fluence équivalente en lumière rouge est déduite des formules suivantes :

$$F_B = t_R \cdot (I_{0R} e^{-\mu_R x}) \cdot (1 - T_R)$$

la fluence F_R correspondante est :
$$F_R = t_R \cdot I_{0R} = F_B / e^{-\mu_R x} \cdot (1 - T_R)$$

2-5- Mesure de la fluorescence tumorale par spectrométrie frontale

Le montage consiste en une fibre optique excitatrice reliée au laser krypron ($\lambda < 415 \text{ nm}$, 32 mW). L'extrémité réceptrice est reliée à un spectrographe de type CP 200 (Jobin Yvon, France) équipé d'un détecteur CCD refroidi à l'azote liquide. Le système est relié à un logiciel qui permet de gérer le temps d'intégration de la CCD et de restituer les données sous forme de courbes calibrées en longueurs d'ondes de 200 à 800 nm.

2-6- Détermination des quantités d'HpD intratumorale

L'extraction et la quantification de l'HpD intratumorale sont réalisées selon la méthode décrite dans le chapitre précédent (cf. chapitre XI, 2-5). Les résultats sont exprimés par rapport aux protéines tissulaires et les quantités extraites sur les tumeurs photoirradiées sont comparées à celles obtenues sur les tumeurs témoins non photoirradiées.

2-7-Dosage indirect de la production des radicaux libres dans la tumeur après photoirradiation

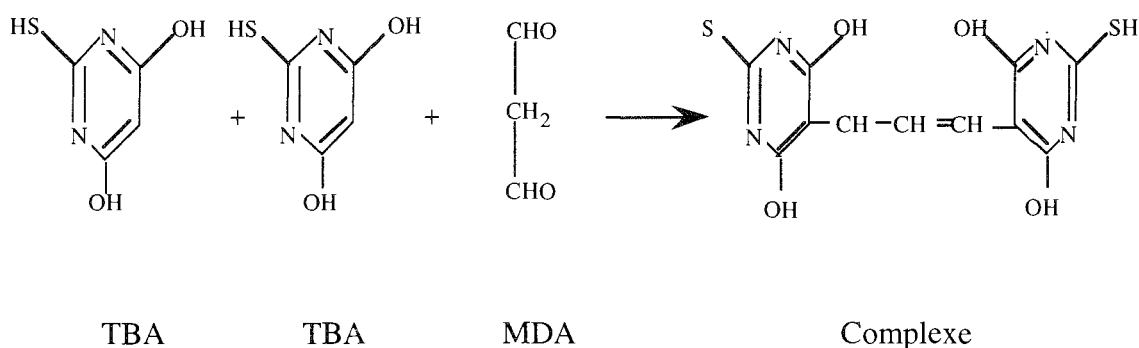
Aucune méthode ne permet actuellement de réaliser une mesure directe des radicaux libres dans les tissus biologiques, seule une approche indirecte par la mesure des produits de la peroxydation lipidique permet d'évaluer le phénomène radicalaire. La mesure de la peroxydation lipidique dans les tumeurs peut rendre compte de l'importance des réactions radicalaires engendrées après photoirradiation.

Parmi les produits de la peroxydation lipidique, nous pouvons citer le malondialdéhyde (ou malonalaldéhyde ou MDA) est le marqueur le plus utilisé en biologie clinique. Ce composé peut provenir de l'oxydation des acides aminés ou des hydrates de carbone, de la synthèse de prostaglandines. Sa principale source est la peroxydation des lipides insaturés des membranes et des lipoprotéines. La libération du MDA à partir des hydroperoxydes est catalysée par des traces de métaux, principalement le fer ferreux (Fe^{2+}).

2-7-1-Principe de dosage du MDA

C'est une méthode de dosage fluorimétrique à l'acide thiobarbiturique (TBA). Deux molécules de TBA se fixent sur une molécule de MDA, à 95°C en milieu acide pour donner un complexe fluorescent rose.

Schéma de la réaction:



2-7-2-Protocole de dosage du MDA dans les tumeurs photoirradiées

Les échantillons tumoraux sont désintégrés au moyen d'un broyeur mécanique (Ultraturax, équipé d'un axe 10) dans 1 ml de PBS. La suspension tumorale obtenue est centrifugée pendant 15 minutes à 29 000 g et le surnageant contenant les débris membranaires est prélevé pour le dosage du MDA. La méthode de mesure choisie utilise l'acide

thiobarbiturique (TBA) et repose sur la propriété de fluorescence du complexe MDA-TBA formé à 95°C en milieu acide. L'intensité de fluorescence est mesurée sur un spectrofluorimètre (Perkin Elmer, France) avec des longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement de 532 et de 553 nm.

2-8-Evaluation de l'évolution du volume tumoral

La réponse biologique est évaluée en terme de croissance tumorale en calculant le rapport V/V_0 , V étant le volume tumoral atteint après un nombre de jours J après traitement et V_0 le volume initial mesuré au jour J_0 .

Le volume tumoral est calculé selon une géométrie sphéroïdale : $V = (\pi/6) \times D_1.D_2.D_3$

D_1 , D_2 et D_3 représentant les trois coordonnées mesurées sur la tumeur : l'épaisseur, la largeur et la longueur. L'évolution de la croissance tumorale est suivie sur cinq différents groupes de souris. Deux groupes témoins, le premier n'ayant pas reçu d'HpD et le second ayant reçu la même dose d'HpD que les groupes traités (10 mg/kg) mais dont les tumeurs ne sont pas exposées à la lumière. En raison des expositions à la lumière ambiante au moment de la mesure des volumes tumoraux, le choix de ce second groupe témoin est justifié par une éventuelle contribution de cette lumière à un effet photodynamique. Les trois autres groupes correspondent aux groupes LB, LR et AS.

Les volumes tumoraux sont mesurées tous les deux jours pendant une durée de vingt jours, et comparés pour les cinq groupes de souris. Pour chaque groupe, le rapport moyen (V/V_0) est obtenu sur une moyenne de 6 souris au minimum.

2-9- Analyse statistique

La comparaison des données a été réalisée par analyse de variance ANOVA utilisant la procédure de Scheffé pour les comparaisons multiples avec une limite de confiance fixée à 95%. La comparaison deux à deux des différentes catégories est réalisée par le test de Mann-Whitney.

3-Résultats

3-1-Mesure de la température tumorale pendant le traitement photodynamique

Aucune augmentation significative de la température tumorale n'a été enregistrée sur les tumeurs pendant leur exposition à la lumière rouge ou à la lumière bleue. Dans ces conditions, aucune contribution de l'effet hyperthermique ne peut être envisagée.

3-2-Calcul des doses équivalentes de lumière

Pour la simulation de la phase thérapeutique nous avons sélectionné une fluence en lumière rouge (630 nm) de 150 J.cm^{-2} (les fluences communément utilisées sont comprises entre 135 et 200 J.cm^{-2}). Pour l'étape de diagnostic par fluorescence nous avons sélectionné une fluence de 1 J.cm^{-2} qui correspond à 30 secondes d'exposition à la lumière ($\lambda < 415 \text{ nm}$) et un taux de photodégradation évalué à 33% par procédé d'extraction chimique de l'HpD intratumorale et à environ 20% par spectrométrie frontale (cf. Chapitre XI, 3-1-2 et 3-2-2).

Temps d'expositions :	$t_B = 31 \text{ secondes}, t_R = 942 \text{ secondes}$
Irradiances :	$I_{0R} = 159 \text{ mW.cm}^{-2}, I_{0B} = 31,8 \text{ mW.cm}^{-2}$
Coefficients d'atténuation global :	$\mu_R = 0,71 \text{ mm}^{-1}, \mu_B = 2,5 \text{ mm}^{-1}$
Absorbances :	$A_R = 0,0269, A_B = 0,561$

Afin de pouvoir comparer l'effet de l'association des deux différentes lumières nous avons calculé pour la fluence en lumière bleue, sa fluence équivalente en lumière rouge (cf. 2-4).

À une distance théorique de 0,5 mm parcourue par le flux lumineux, les fluences théoriques calculées sont $0,280 \text{ J.cm}^{-2}$ pour le groupe LB, 105 J.cm^{-2} pour le groupe LR.

Pour une fluence F_B en lumière bleue de $0,280 \text{ J.cm}^{-2}$, sa fluence F_R équivalente en lumière rouge correspond à $6,5 \text{ J.cm}^{-2}$. Elle est déduite des formules suivantes :

$$F_B = t_R \cdot (I_{0R} e^{-\mu_R x}) \cdot (1 - T_R)$$

$$F_R = t_R \cdot I_{0R} = F_B / e^{-\mu_R x} \cdot (1 - T_R)$$

Ces fluences théoriques vont nous permettre de comparer les résultats obtenus avec les différents modes de photoirradiation.

3-3-Evaluation par spectrométrie frontale du taux de photoblanchiment sur tumeurs photoirradiées

Les spectres de fluorescence sont enregistrés sur les tumeurs avant et après photoirradiation. Les figures XII.1, XII.2 et XII.3 représentent le profil type des spectres obtenus respectivement après photoirradiation en lumière bleue, en lumière rouge et en association séquentielle des deux lumières. Les spectres d'émission de fluorescence présentent deux pics d'émission majoritaires l'un vers 630 nm et l'autre vers 694 nm. Le pourcentage de photoblanchiment est déduit de la diminution de l'intensité du pic majoritaire de fluorescence à 630 nm. En associant les deux lumières, nous observons (figure XII.3) une modification de l'allure du spectre illustrée par une augmentation de fluorescence entre 655 et 665 nm qui témoigne probablement de l'apparition de photoproduits qui fluorescent à ces longueurs d'onde.

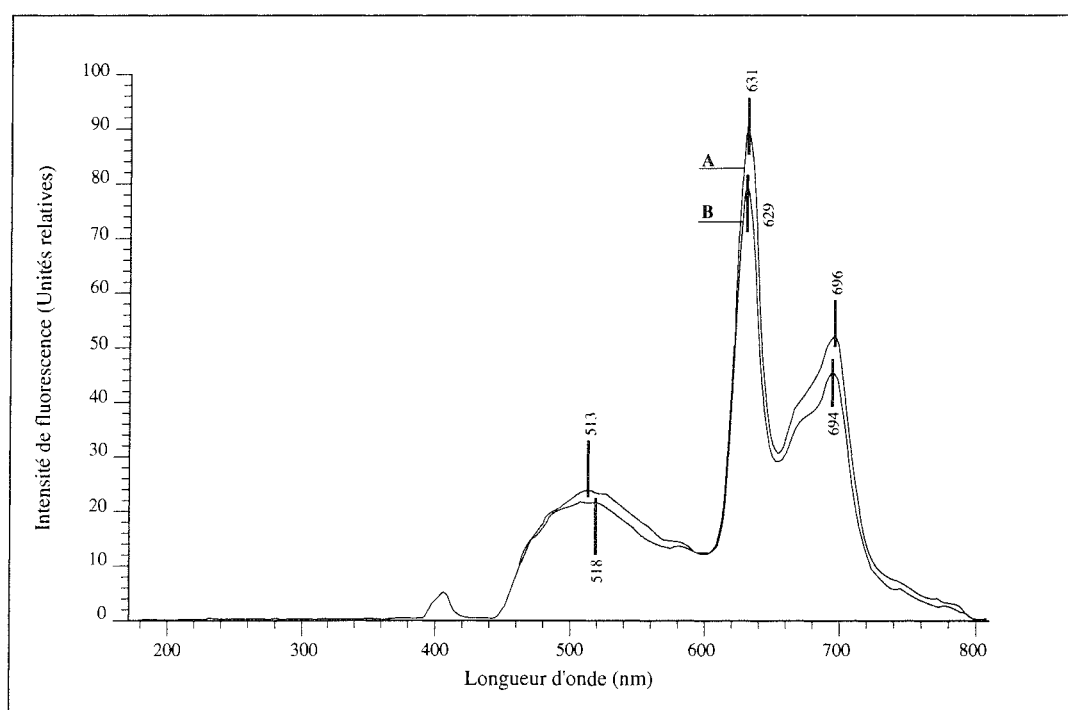


Figure XII.1 : Spectres d'émission de fluorescence sur tumeurs HT29 enregistrés 24h après injection aux souris d'une dose d'HpD de 10 mg/kg. Spectre A, avant photoirradiation et spectre B après photoirradiation en lumière bleue (1 J.cm^{-2})

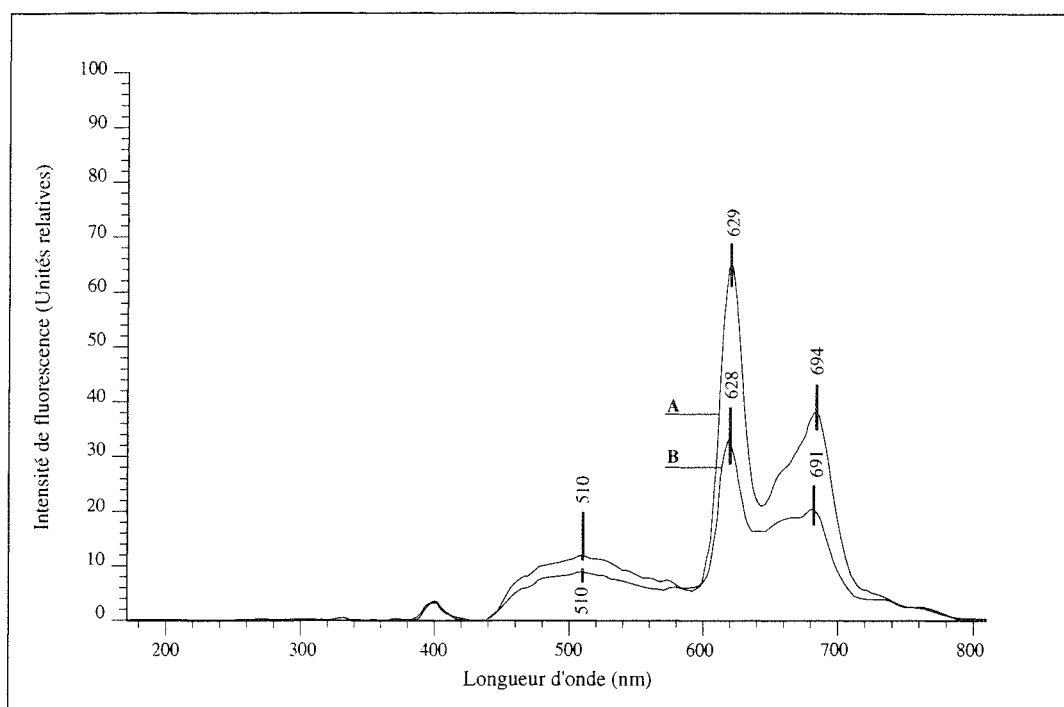


Figure XII.2 : Spectres d'émission de fluorescence sur tumeurs HT29 enregistrés 24h après injection aux souris d'une dose d'HpD de 10 mg/kg. Spectre A, avant photoirradiation et spectre B après photoirradiation en lumière rouge (150 J.cm^{-2})

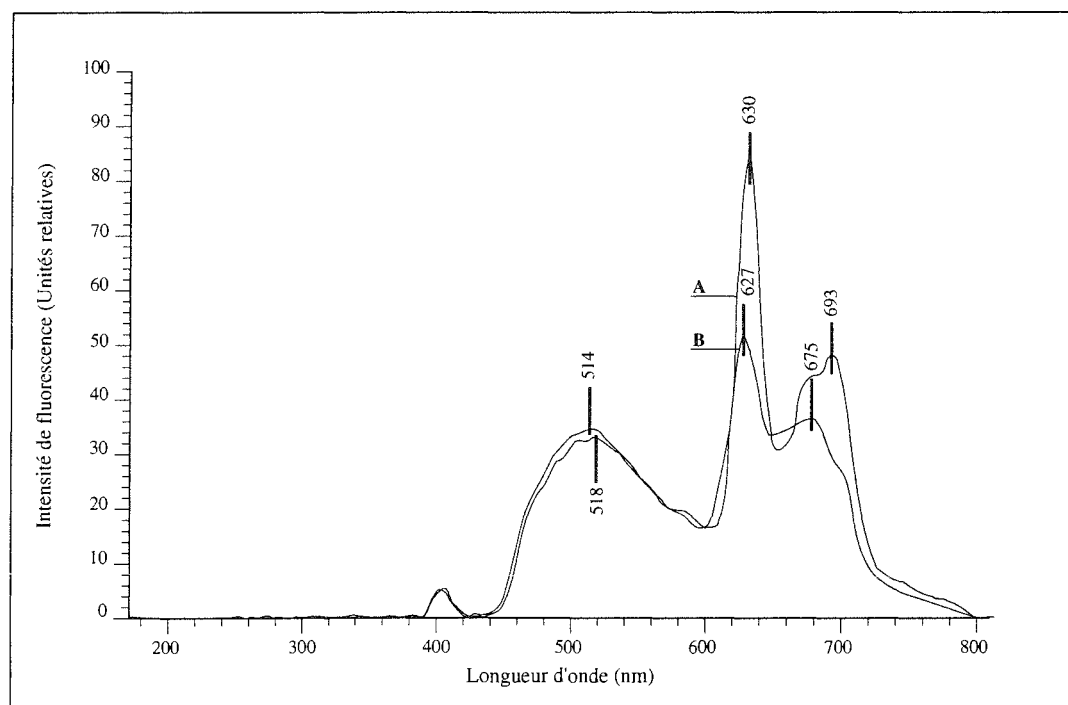


Figure XII.3 : Spectres d'émission de fluorescence sur tumeurs HT29 enregistrés 24h après injection de 10 mg/kg d'HpD Spectre A, avant photoirradiation et spectre B après association des deux lumières : bleue 1 (J.cm^{-2}) et rouge (150 J.cm^{-2}).

Le taux de photoblanchiment est calculé pour chaque modalité de traitement sur quatre souris différentes, les valeurs obtenues sont présentées tableau XII.1.

Tableau XII.1 : Pourcentages de photoblanchiment déduits de la diminution de l'intensité du pic d'émission à 630 nm sur les spectres d'émission de fluorescence obtenus après photoirradiation des tumeurs en lumière bleue (1 J.cm^{-2}), en lumière rouge (150 J.cm^{-2}) et en associant les deux lumières. Les résultats représentent la moyenne obtenue sur un nombre minimal de quatre souris ($\pm$ écart type).

% de photoblanchiment		
Lumière bleue	Lumière rouge	association séquentielle des deux lumières
11,8 $\pm$ 2,4	42,0 $\pm$ 6,7	35,0 $\pm$ 2,6

Les résultats obtenus (tableau XII.I) démontrent que le taux de photoblanchiment observé sur le groupe LB est environ de 3,5 inférieur au groupe LR et environ de 3 fois inférieur groupe AS. L'analyse de variance au sein des trois groupes de souris démontre une différence hautement significative ($p=0,0001$) entre le groupe LB et les deux autres groupes. En revanche aucune différence n'est constatée entre le groupe LR et le groupe AS.

3-4- Evaluation du taux de photoblanchiment par extraction chimique de l'HpD intratumorale

Cette méthode chimique va permettre de déterminer les quantités d'HpD intratumorale. Nous comparerons ensuite les quantités d'HpD extraites sur les tumeurs témoins non-photoirradiées et sur les trois autres groupes LR, LB, et AS. Les mesures ont été faites sur cinq tumeurs dans chaque groupe.

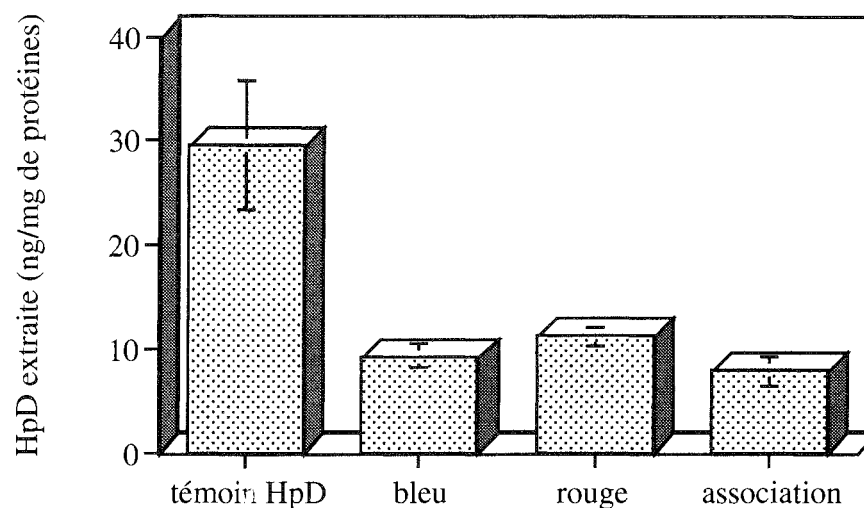


Figure XII.4 : Quantités d'HpD extraites 24h après injection d'une dose d'HpD équivalente à 10 mg/kg, sur tumeurs témoins HT29 sans photoirradiation et sur tumeurs exposées à la lumière bleue (1J.cm^{-2}), à la lumière rouge (150J.cm^{-2}) et à l'association des deux. Les résultats correspondent aux quantités moyennes obtenues sur cinq tumeurs ($\pm$ écart type).

La comparaison des quantités extraites sur les quatre groupes de souris révèle une différence hautement significative entre le témoin et les tumeurs photoirradiées (tableau XII.2). En revanche, la comparaison deux à deux des quantités d'HpD extraites sur les groupes LB, LR et AS ne révèle aucune différence significative.

Tableau XII.2 : Comparaison des quantités d'HpD extraites des différents groupes de tumeurs (test Mann-Whitney), $n=5$; seuil de significativité $p=0,05$, NS : différence non significative.

Comparaison	Significativité
témoin vs. bleu	$p=0,0117$
témoin vs. rouge	$p=0,0365$
témoin vs. association	$p=0,009$
bleu vs. rouge	NS
bleu vs. association	NS
rouge vs. association	NS

3-5-Evaluation de la peroxydation lipidique au niveau des tumeurs

Les mesures ont été effectuées sur cinq tumeurs dans chaque groupe.

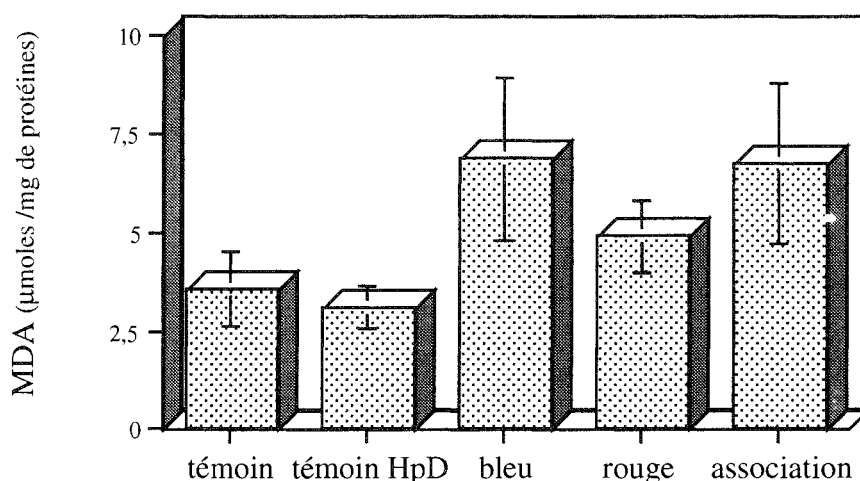


Figure XII.5 : Quantités de MDA extraites sur des tumeurs HT29 non photoirradiées (sans HpD : témoin avec HpD : témoin HpD) et exposées à la lumière bleue (1 J.cm^{-2}), à la lumière rouge (150 J.cm^{-2}) et à l'association des deux. Les résultats correspondent aux quantités moyennes obtenue sur cinq tumeurs ($\pm$ écart type).

Aucune différence significative n'est observée entre les quantités de MDA extraites des échantillons tumoraux témoins sans HpD ou avec HpD. La différence est par ailleurs hautement significative ($p < 0,02$, test d'analyse de variance) entre ces témoins et les échantillons tumoraux photoirradiés.

Aucune différence significative n'est observée entre les quantités moyennes de MDA extraites pour les groupes LB et AS. En revanche une faible tendance ($p < 0,1$) existe entre le groupe LB et le groupe LR, le groupe AS et le groupe LR.

3-6- Evolution du volume des tumeurs après traitement

L'évolution de la croissance tumorale est suivie sur cinq différents groupes de souris. Deux groupes témoins : le premier n'ayant pas reçu d'HpD et le second ayant reçu la même dose d'HpD que les groupes traités (10 mg/kg) mais dont les tumeurs ne sont pas exposées à la lumière. Les trois autres groupes correspondent aux groupes LB, LR, et AS. Les mesures sont effectuées sur une moyenne de 6 souris au minimum.

L'évolution de la croissance tumorale est illustrée par la représentation des volumes relatifs (V/V_0) en fonction du nombre de jours après traitement (figure XII.6).

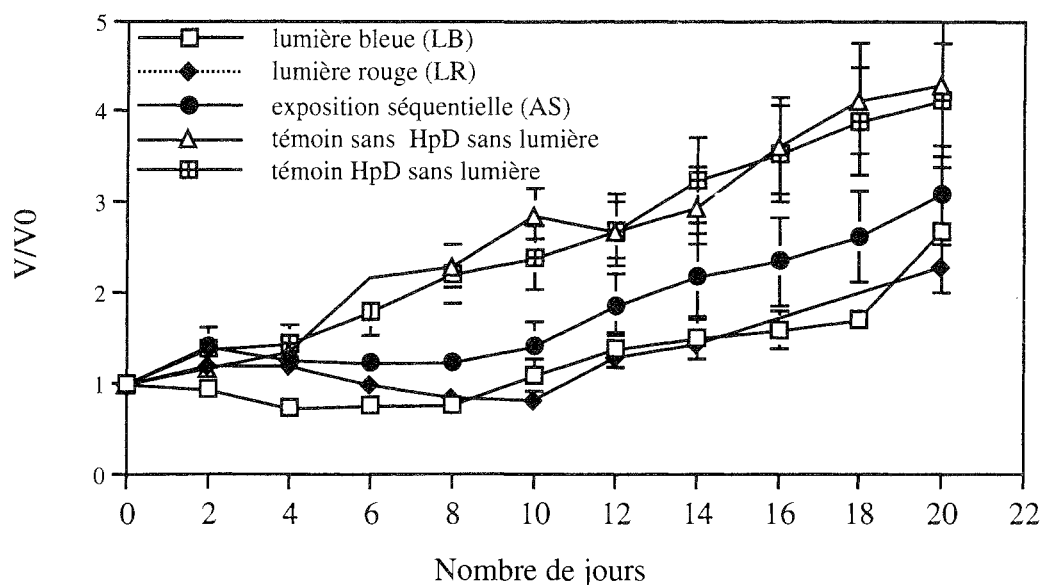


Figure XII.6 : Croissance tumorale sur cinq différents groupes de souris, deux groupes témoins non photoirradiés sans HpD et avec HpD et trois autres groupes correspondant aux souris traitées par exposition à la lumière bleue (1 J.cm^{-2}) à la lumière rouge (150 J.cm^{-2}) et à l'association séquentielle des deux lumières. Chaque groupe est constitué d'un nombre minimal de 6 souris.

La comparaison des rapport moyens (V/V_0) des deux groupes témoins ne révèle aucune différence significative. Ces deux courbes témoins se distinguent avec une cinétique de croissance linéaire et plus rapide que celle des groupes de souris traitées. En effet, pour atteindre un volume 1,5 fois supérieur au volume initial, la durée requise par les tumeurs témoins est en moyenne de 5 jours, elle est d'environ 14 jours pour le groupe LB, de 15 jours pour le groupe LR et de 11 jours uniquement pour le groupe AS.

Nous constatons chez les groupes LR et AS une augmentation initiale du volume tumoral en raison de l'apparition d'un œdème qui survient à l'issue de la photoirradiation en lumière rouge. Cet effet semble se résorber à partir du quatrième jour. Par conséquent nous comparerons les cinétiques de croissance tumorale chez les différents groupes à partir du jour J₄. En revanche, pour le groupe LB la décroissance du volume tumoral se produit entre J₀ et J₄.

Une stabilisation de l'évolution du volume tumoral est observée chez les groupes LB et AS entre j_4 et j_8 suivie d'une reprise de la croissance. Pour le groupe LR il ya une décroissance du volume tumoral jusqu'à j_{10} .

Pour la cinétique des deux groupes LR et LB, la comparaison statistique deux à deux des données ne révèle aucune différence significative. Les différences constatées au quatrième et au sixième jour sont dues à un œdème persistant au niveau des tumeurs du groupe LR.

La cinétique d'évolution des tumeurs du groupe AS est plus rapide, elle est illustrée par une courbe qui se situe au dessus de celles des groupes LB et LR.

La comparaison statistique des données du groupe LB et du groupe AS révèle une différence significative ($p < 0,05$) sur toute la durée du suivi de l'évolution tumorale excepté pour les jours J_{10} , J_{14} et J_{20} .

Par ailleurs, la comparaison des données obtenues sur le groupe AS et le groupe LR démontre une différence significative ($p < 0,05$) uniquement les huit premiers jours, ensuite les croissances tumorales des deux groupes de tumeurs se rejoignent.

4-Discussion

Le premier objectif de cette étude était de démontrer si une première exposition des tumeurs à une lumière à visée de diagnostic altère l'efficacité de la seconde photoirradiation à visée thérapeutique. A cette question, seule l'évaluation de l'efficacité biologique peut procurer une réponse. Néanmoins les différents événements physico-chimiques pouvant survenir lors des différentes étapes d'illumination peuvent fournir les données nécessaires à la compréhension des phénomènes photodynamiques en général et du phénomène de photodégradation en particulier.

Détermination de taux de photoblanchiment par évaluation de la décroissance de fluorescence de l'HpD intratumorale.

Les résultats obtenus démontrent un taux de photoblanchiment pour le groupe LB d'environ 3,5 inférieur à ceux obtenus pour les groupes LR et AS. Sachant que la fluence théorique du groupe LB est de $6,5 \text{ J.cm}^{-2}$, c'est à dire une fluence environ 16 fois inférieure à celle du groupe LR, ces résultats semblent conformes à la relation qui lie le phénomène de photodégradation à la dose de lumière.

Néanmoins, considérant cette même relation et sachant que pour le groupe AS les deux fluences s'additionnent pour donner une fluence théorique de $111,5 \text{ J.cm}^{-2}$, le taux de

photoblanchiment devrait être supérieur à celui obtenu pour une fluence théorique de 105 J.cm^{-2} en lumière rouge. L'absence de différence entre des taux de photoblanchiment obtenus dans ces deux groupes de tumeurs apparaît par conséquent paradoxale.

Ces données démontrent la complexité de l'étude d'un tel phénomène par une méthode spectrofluorimétrique. Il est en effet très difficile de réaliser une évaluation objective de ce phénomène *in vivo* car à la fluorescence de l'HpD peut se rajouter celle des substrats biologiques émettant aux mêmes longueurs d'ondes, notamment celle des porphyrines endogènes dont les pics d'émission se situent à 630 et à 677 nm. A cette fluorescence peut également se rajouter celle des produits de la phototransformation. Lors de l'association des deux lumières, la fluence théorique étant relativement importante ($111,5 \text{ J.cm}^{-2}$), nous constatons une modification de l'allure du spectre d'émission avec une augmentation de la fluorescence entre 655 et 665 nm (figure XII.3) et qui témoigne de l'apparition de photoproduits fluorescents. Ces données sont en accord avec les résultats obtenus *in vitro* sur les spectres des solutions d'HpD supplémentées de SVF (Chapitre IX, figure 12), nous avons observé une augmentation de fluorescence similaire entre 645 et 655 nm que nous avons identifié par spectrofluorimétrie comme de nouveaux pics relatifs à des photoproduits. Ces observations corroborent par ailleurs les données obtenues par Moan qui a observé un épaulement similaire entre 645 et 650 nm sur des solutions d'HpD photoirradiées (Moan, 1986).

Hormis ces photoproduits déjà observés sur solutions, il n'est pas exclu qu'à 630 nm, bande d'émission maximale de l'HpD, il y ait contribution de produits fluorescents dont l'existence serait masquée par celle de la molécule mère d'HpD et pourraient modifier le taux global de photoblanchiment déduit de la diminution de l'intensité du pic à 630 nm.

Le troisième facteur qui pourrait contribuer à la difficulté d'évaluation du taux de photoblanchiment par cette méthode est d'ordre technique. En effet, l'utilisation d'un spectromètre avec une source d'excitation dans le bleu dont la profondeur de pénétration dans les tissus est limitée ne peut rendre compte que de l'extinction de fluorescence des molécules superficielles. Par conséquent, l'évaluation du phénomène n'est pas déduite de la diminution de fluorescence de la totalité des molécules intratumorales mais uniquement de celle des molécules superficielles ce qui induirait une surestimation du phénomène.

Considérant tous ces facteurs, il semble difficile dans ces conditions d'obtenir une évaluation rigoureuse de la constante de photoblanchiment par cette méthode de mesure.

Détermination de taux de photoblanchiment par une méthode chimique d'extraction de l'HpD intratumorale

En assimilant les fluences utilisées dans chaque groupe de souris à des fluences équivalentes en lumière rouge, nous obtenons après correction à une distance théorique de 0,5 mm une fluence de 6,5 J.cm⁻² pour le groupe LB, de 105 J.cm⁻² pour le groupe LR et de 111,5 J.cm⁻² pour le groupe AS.

L'analyse statistique des quantités d'HpD extraites des différents groupes de tumeurs ne démontre aucune différence significative bien que la fluence théorique utilisée en lumière bleue soit environ 16 fois inférieure à la fluence en lumière rouge.

Cette absence de différence entre les taux de photoblanchiment suggérerait que selon la longueur d'onde de lumière utilisée les processus photodynamiques impliqués soient différents.

La lumière rouge pénétrant plus profondément dans les tissus, on pourrait supposer que les molécules de porphyrine peuvent absorber l'énergie photonique même à l'intérieur de la tumeur. Les états triplets excités de l'HpD pourront ensuite céder soit directement leur excédent d'énergie à l'oxygène moléculaire de l'environnement tumoral et engendrer la production d'oxygène singulet (réaction de type II) soit indirectement via un substrat oxydable du milieu (réaction de type I). Les réactions photodynamiques qui risqueraient de se produire dans de telles conditions impliqueraient majoritairement l'oxygène.

En revanche, en ce qui concerne la lumière bleue, le transfert de l'énergie photonique des molécules de porphyrines à l'oxygène n'est envisageable que sur la partie superficielle de la tumeur. Par conséquent, un transfert direct des états triplets excités de l'HpD vers l'oxygène moléculaire en profondeur de la tumeur n'est pas envisageable. En revanche, nous avons montré que le taux de photoblanchiment ne dépendait pas directement de la profondeur de pénétration de la lumière dans le tissu (cf chapitre XI, 4) et nous avons envisagé la possibilité de l'intervention d'un troisième processus photodynamique dans lequel les porphyrines dans leur état triplet interagiraient par un processus de transfert d'électrons avec des radicaux libres formés intrinsèquement dans le tissu tumoral (Gal 1992). Ce mécanisme de type radicalaire contribuerait pour une large part au processus photodynamique global (Shulyakovskaya *et al*, 1993).

La différence de résultats obtenus entre les deux lumières résiderait alors dans la différence des taux relatifs de participation de chacune des réactions photodynamiques au processus global de photodégradation.

Evaluation du taux des processus photodynamiques radicalaires par une méthode biochimique de dosage du MDA.

Nous observons sur les échantillons tumoraux témoins (avec ou sans HpD) l'existence d'une quantité de radicaux libres initiale imputable aux réactions radicalaires endogènes dans les tissus néoplasiques (Emanuel, 1977). Aucune différence significative n'est observée entre le témoin sans HpD et le témoin avec HpD ce qui confirme que l'HpD en absence de lumière n'engendre aucun processus radicalaire propre. La comparaison des quantités de MDA extraites des tumeurs photoirradiées ne révèle aucune différence significative entre les trois groupes. Cette absence de significativité est probablement due à la grande variabilité inter-essais souvent rencontrée dans les essais *in vivo* et également à la complexité de dosage des produits radicalaires.

Néanmoins, la tendance à la production accrue de radicaux libres dans les essais impliquant la photoirradiation en lumière bleue semble être marquée. Si l'on considère qu'il existe une relation directe entre la dose de lumière, l'effet photodynamique et la production de radicaux libres, nous devrions nous attendre à ce que le taux de peroxydation lipidique soit plus important pour les tumeurs photoirradiées en lumière rouge que pour celles photoirradiées en lumière bleue, nous observons pourtant la tendance inverse.

Cet effet paradoxal pourrait être expliqué par la différence des durées d'exposition pour chaque modalité de photoirradiation. En effet, une fluence de 1 J.cm^{-2} en lumière bleue nécessite un temps d'exposition relativement court (30 secondes) tandis qu'une fluence de 150 J.cm^{-2} en lumière rouge nécessite un temps d'exposition plus long (8 minutes). Pendant les temps d'exposition prolongés un processus métabolique protecteur vis à vis des radicaux libres pourrait se manifester par la libération d'antioxydants endogènes susceptibles de piéger ces produits. La participation du glutathion réduit (GSH) a également été citée dans la réparation et la protection du stress oxydatif provoqué par les processus photodynamiques. Le GSH peut agir selon différentes voies, il peut piéger les espèces radicalaires telles les espèces actives de l'oxygène $^1\text{O}_2$ (oxygène singulet) et O_2^- (ion superoxyde) ainsi que les radicaux hydroxyles $\text{OH}^\bullet$ et le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 (Thomas & Girotti, 1989). Le GSH peut également intervenir en tant que substrat de la GSH-péroxydase, enzyme impliquée dans la détoxification de $^1\text{O}_2$ ainsi que celle d'une grande variété d'hydroperoxydes organiques tels les hydroperoxydes lipidiques (Flohe 1982).

D'autre part, la production accrue de MDA dans les essais impliquant la lumière bleue pourrait expliquer le taux de photodégradation important observé par extraction chimique sur les tumeurs du groupe LB et du groupe AS. Il a été en effet démontré qu'une irradiation en lumière ultra-violette ou visible induisait dans les cellules un photoblanchiment de

l'HpD nettement plus prononcé dans la membrane plasmique que dans les autres compartiments cellulaires (Schneckenburger *et al*, 1988). Ceci est dû à la peroxydation photoinduite des lipides membranaires qui semble être impliquée dans le phénomène de photoblanchiment des porphyrines (Reyftmann 1986, Morlière *et al* 1987).

Cette différence de lipoperoxydation membranaire entre les groupes LB et AS et le groupe LR pourrait par ailleurs conforter l'hypothèse de l'existence d'une différence entre les taux relatifs de participation des trois différents processus photochimiques (réaction de type I, de type II et de type III) à l'ensemble du processus de photodégradation. Les processus radicalaires semblent en effet être plus prononcés en cas de photoirradiation par la lumière bleue.

Nous observons par ailleurs qu'en dépit d'une fluence théorique nettement supérieure dans le groupe AS, la quantité de MDA est comparable à celle des tumeurs du groupe LB. Il est très possible que lors de l'exposition à la lumière bleue le seuil supérieur de production de MDA soit atteint, ce qui expliquerait qu'aucune différence n'apparaisse entre les deux essais. L'effet des anti-oxydants endogènes qui pourraient intervenir lors de la seconde exposition en lumière rouge pourrait également être incriminé.

Evaluation des effets biologiques en suivant l'évolution du volume tumoral sur les souris traitées.

L'évolution du volume tumoral après exposition séquentielle aux deux lumières révèle un effet moindre qui témoigne de l'altération de l'activité photodynamique. Il est difficile d'attribuer cette perte d'efficacité à un photoblanchiment strict des molécules d'HpD lors de la première exposition des tumeurs à la lumière bleue. En effet, aucune relation directe ne permet de lier les résultats du test biologique à celles des différentes autres méthodes d'évaluation.

En revanche, sachant que pour des raisons techniques les deux expositions à la lumière peuvent être espacées d'environ 20 à 30 minutes, nous pouvons assimiler cette modalité de photoirradiation à un fractionnement de doses. Les résultats concernant ce phénomène sont très controversés. Moan (1979) a démontré sur culture de cellules que pour une même dose totale de lumière, plus le temps séparant les photoirradiations est élevé et plus la cytotoxicité est importante. Ainsi la première exposition à la lumière devrait initier un processus qui fragiliserait les cellules et les rendrait plus photosensibles. Grasczew et Shopova (1988) ont observé *in vivo* un meilleur effet tumoral après fractionnement de la dose de lumière.

D'autres travaux ont par ailleurs démontré des données totalement contradictoires, Merlin *et al* (1992) et Foultier *et al* (1989) rapportent une altération du pouvoir de

photoinactivation cellulaire suite au fractionnement des doses de lumières. Benstead et Moore (1988) a également démontré *in vivo* que le fractionnement de la lumière induisait la nécrose au niveau des tissus tumoraux et épargnait les tissus sains. La diminution de la cytotoxicité après une double photoirradiation peut être expliquée par l'installation d'un processus métabolique de réparation évoqué précédemment.

Nos résultats sont plus en accord avec ces données, il est en effet très possible que le laps de temps de 20 à 30 minutes séparant les deux photoirradiations soit suffisant pour initier un processus de réparation et de détoxification à l'origine de la diminution de la régression tumorale et pourtant on pourrait aussi évoquer un rôle - en sens inverse - d'une réoxygénation des tissus.

5-Conclusion et perspectives

Dans cette dernière partie de notre étude nous avons pour objectif de reproduire sur un modèle *in vivo* le schéma d'un protocole clinique hypothétique où un diagnostic par détection de fluorescence précéderait un traitement photodynamique et de démontrer si l'association séquentielle de deux photoirradiations avait pour conséquence une altération de l'efficacité de la PDT.

Seul le test biologique nous a permis de répondre à cette question pour laquelle les autres méthodes d'évaluation physiques ou chimiques ne peuvent fournir une réponse objective. Nous n'avons en effet constaté aucune relation directe pouvant lier les données obtenues par les trois méthodes d'évaluation indirecte aux conséquences biologiques réellement observées sur les souris.

D'autre part, malgré des données environnementales, géométriques, physiques et optiques totalement différentes entre les milieux *in vitro* et *in vivo* l'altération des effets de la PDT lors d'une association séquentielle des deux lumières semble incontestable dans les deux cas.

Néanmoins, avant de conclure hâtivement à un tel effet et de l'extrapoler au domaine clinique, il serait intéressant de poursuivre les essais d'évaluation de l'effet biologique *in vivo* sur une large gamme de fluences en lumière rouge et en lumière bleue.

Nous avons montré dans les essais *in vitro* que l'effet négatif des deux photoirradiations avait tendance à s'estomper à certaines fluences d'exposition en lumière bleue. Cette amélioration a été expliquée par la production de produits avec une nouvelle bande d'absorption à 642 nm et dont l'existence a été suggérée par des mesures d'absorbance

différentielle. Ces produits ont souvent été démontrés dans la littérature par des mesures *in vitro* et *in vivo* (Moan 1988, König 1990, Rotomskiene *et al*, 1988 ; Dietel *et al*, 1990). Ils peuvent avoir une activité photodynamique importante et un pouvoir d'inhibition de la croissance tumorale supérieurs à celui de l'HpD (Giniunas *et al*, 1990), de plus leur efficacité photodynamique a été montrée à des longueurs d'ondes inférieures à 640 nm (Dietel *et al*, 1990).

Au vu de ces données bibliographiques et de nos propres résultats obtenus *in vitro*, il serait intéressant de poursuivre ces essais et de prospecter un large intervalle de fluences afin de cibler la production optimale de ces produits.

D'autre part, pour répondre à une question plus fondamentale concernant la différence des taux de participation des processus radicalaires pour la lumière rouge et la lumière bleue, il serait intéressant d'administrer la même dose d'énergie en lumière bleue et rouge et de comparer les quantités de radicaux libres produits pour chaque photoirradiation.

Conclusion générale et perspectives

CONCLUSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES

1-Nous avons montré que la simulation de l'association séquentielle de deux photoirradiations avait pour conséquence d'altérer l'efficacité photodynamique.

Cet effet qui aurait tendance à s'estomper dans les essais *in vitro* pour certaines fluences d'exposition lors de la première photoirradiation suggèrerait l'existence de deux phénomènes simultanés : photodégradation des molécules initiales et la formation de photoproduits pourvus d'une activité photodynamique qui compenserait partiellement la destruction du photosensibilisateur.

Les mesures d'absorbance et de fluorescence sur des solutions d'HpD supplémentées de SVF ont révélé l'apparition de nouveaux pics relatifs aux photoproduits de l'HpD. Nous avons plus particulièrement observé les produits avec une nouvelle bande d'absorption vers 642 nm. Leur efficacité photodynamique même à des longueurs d'ondes inférieures à 640 nm a été rapportée dans la littérature. En absorbant au niveau des longueurs d'ondes plus éloignées dans le rouge, ces photoproduits offrent la possibilité d'utilisation d'une lumière avec un coefficient de pénétration beaucoup plus important au niveau des tissus biologiques.

Dans le modèle *in vivo*, malgré l'organisation tri-dimensionnelle et la complexité des phénomènes optiques, l'altération des effets de la PDT observée *in vitro* sur le modèle cellulaire en monocouche, est retrouvée. Cependant, si les essais analysant la régression tumorale permettent d'aboutir à une telle conclusion, toutes les autres méthodes indirectes d'évaluation soulignent la complexité des phénomènes mis en jeu au cours des réactions photobiologiques.

En effet, malgré une meilleure pénétration de la lumière rouge et une dose de lumière deux fois supérieure, l'indice de peroxydation lipidique ou le taux de photoblanchiment évalué par extraction chimique de l'HpD sont supérieurs en lumière bleue. Ces résultats révèlent une absence de corrélation apparente entre la quantité d'énergie absorbée par le photosensibilisateur et le photoblanchiment et suggèrent la participation de processus photodynamiques différents selon la longueur d'onde de lumière utilisée.

2-Le second objectif de ce travail, était d'évaluer les constantes de photodégradation dans différents environnements biologiques in vivo et in vitro.

La présence de SVF dans les solutions d'HpD nous a permis de travailler en présence de plusieurs biomolécules photo-oxydables pouvant interagir avec les porphyrines. Un tel

système est assimilable à un milieu biologique. Dans ces conditions, la cinétique et les rendement de photoblanchiment sont modifiés, les processus de photodégradation semblent emprunter les voies photochimiques de type II et de type I avec une prédominance pour cette dernière. D'autre part, l'analyse comparative des constantes de photodégradation évaluées par les différentes méthodes révèle que les méthodes spectrométriques sous estiment les conséquences réelles de la photodégradation de l'HpD dans le milieu biologique. Seule la constante de photoblanchiment déduite de la réduction du pouvoir de photoinactivation cellulaire permet une évaluation objective des conséquences de la photodégradation du produit.

La détermination des constantes de photodégradation de l'HpD sur tumeurs HT29 photoirradiées et l'analyse comparative des taux de photodégradation obtenus avec deux longueurs d'onde de photoirradiations différentes (413 et 630 nm) démontrent d'une part que la faible pénétration de la lumière bleue dans les tissus n'est pas un facteur limitant et que les réactions photochimiques induites impliquent l'intervention de chaînes de réactions radicalaires. D'autre part, la comparaison des constantes évaluées par la même méthode d'extraction chimique sur les tumeurs HT29 photoirradiées en lumière rouge et lumière bleue démontre un taux de photoblanchiment plus important en lumière bleue.

Après ces observations, différentes perspectives s'imposent. La première concerne la poursuite des essais d'évaluation de l'effet biologique *in vivo* sur une large gamme de fluences en lumière rouge et en lumière bleue. Il n'est pas exclu que sous certaines conditions de photoirradiations nous puissions observer la production de photoproduits actifs que l'on pourrait exploiter pour améliorer l'efficacité photodynamique.

Si ces photoproduits existent nous pourrions envisager des essais avec une illumination simultanée avec deux raies de lumières, la première susceptible d'exciter la molécule mère d'HpD ($\lambda=630\text{nm}$) et la seconde les photoproduits ($\lambda=642\text{nm}$). L'efficacité photodynamique pourrait être ainsi améliorée et la photodégradation compensée par exploitation en temps réel des produits de la phototransformation.

Nous avons également démontré que la faible pénétration de la lumière bleue dans les tissus biologiques n'était pas un facteur limitant à la propagation du processus de photodégradation au sein de la tumeur. Si cette hypothèse est vraie, il est important de considérer que des réactions photodynamiques qui conduisent au photoblanchiment du photosensibilisant ne sont pas exclusives et induisent un effet PDT au niveau de la tumeur. A l'issue de cette hypothèse, nous envisageons de rechercher si un tel effet existe, en suivant la régression tumorale des tumeurs photoirradiées à différentes doses de lumière bleue.

Notre dernière perspective concerne une question plus fondamentale, la différence des taux de participation des processus radicalaires pour la lumière rouge et la lumière bleue. Il serait intéressant d'administrer la même dose d'énergie en lumière bleue et en lumière rouge et de comparer par la suite les quantités de radicaux libres produits pour chaque photoirradiation.

Références bibliographiques

Abdul Nour C.

Identification de paramètres optiques de structures tissulaires. Instrumentation prototype associée. Application à la dosimétrie de la thérapie photodynamique, *Thèse de doctorat INPL*, Janvier 1994.

Ackerman N.B. Hechmer P.A.

Studies on the capillary permeability of experimental liver metastases, *Surg. Gynecol. Obstet.* 146, 884, 1978.

Agarwal M.L., Clay M.E., Harvey E.J., Evans H.H., Antunez A.R., Oleinick N.L.

Photodynamic therapy induces rapid cell death by apoptosis in L5178Y mouse lymphoma cells. *Cancer Res.* 51, 5993-5996, 1991.

Aida M. and Hirashima T.

Cancer of the esophagus. In *Lasers and Hematoporphyrin Derivative in Cancer*. (Edited by Y. Hayata and T.F. Dougherty), Igaku-Shoin, New York p 57, 1983.

Andreoni A., Cubeddu R., De Silvestri S., Jori G., Laporta P., Reddi E.
Time-resolved fluorescence studies of hematoporphyrin in different solvent systems. *Z. Naturforsch* 38, 83-89, 1983.

Arnfield M., Gonzalez S., Lea P.

Cylindrical irradiation fibre tip for photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.* 6, 150-154, 1986.

ATCC

Catalogue of Cell lines and hybridomas 6 Th Edition, 1988.

Auler H., Banzer G.

Unter suchungen uber die rolle der porphyrine BEI Geschwol Stkranken menschen und tieren. *Z. Krebsforsch* 53, 65-68, 1942.

Aveline B.

Réaction photochimique de porphyrines vinyliques développement de photosensibilisateurs de type chlorine. *Thèse de doctorat de l'Université Paris VI*, Septembre 1992.

Azzi V.

L'hématoporphyrine dérivée "HpD" préparation, analyse, purification, conservation et évaluation de la cytotoxicité in vitro en vue d'une utilisation en thérapie photodynamique anticancéreuse, *Thèse de doctorat de l'Université de Nancy I*, Septembre 1993.

Azzi V., Notter D., Merlin J.L., Wollf C., Tanielian C., Labrude P. Vigneron C., Guillemin F.

Composition and spectral characteristics, cytotoxicity and quantum yield of singlet oxygen formation of hæmatoporphyrin preparation. *Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers*. (edited by Spinelli P, Dal Fante M, Marchesini R), Elsevier Sciences Publishers, Amsterdam, 715-719, 1992

Balchum O.J., Doiron D.R.

Photoradiation therapy of endobronchial lung cancer. *Clin. Chest. Med.* 6, 255, 1985.

Bandieramonte, C., Marshesini, R., Melloni, E., Andreoli, C., Di Pietro, S., Spinelli, P., Fava, G., Zunino, Z. and emanuelli, H.

Laser phototherapy following HpD administration in superficial neoplastic lesions. *Tumori*, 70, 327, 1984.

- Barr H., MacRobert A.J., Tralau C.J., Boulos P.B., Bown S.G.**
The significance of the nature of the photosensitizer for photodynamic therapy , quantitative and biological studies in the colon. *Br. J. Cancer*, 62, 730-735, 1990
- Baumgartner R., Fisslinger H., Joham D., Lenz H., Ruprecht L., Stepp H., Unsold E.**
A fluorescence imaging device for endoscopic detection of early stage cancer. Instrumental and experimental studies. *Photochem. Photobiol.*, 5, 759-763, 1987.
- Beems E.M., Dubbelman T.M.A.R., Lugtenburg J., Van Best J.A., Smeets M.E.M.A., Boegheim J.P.**
Photosensitizing properties of bacteriochlorophyllin a and bacteriochlorin a, two derivatives of bacteriochlorophyll a. *Photochem. Photobiol.*, 46, 639-643, 1987.
- Bellnier D., Ho K., Pandey R.K., Missert J., Dougherty T.J.**
Distribution and elucidation of the tumor-localizing component of hematoporphyrin derivative in mice. *Photochem. Photobiol.*, 50, 221-228, 1989.
- Bellnier D.A., Dougherty T.J.**
The time course of cutaneous porphyrin photosensitization in the murine ear. *Photochem. Photobiol.*, 49, 369-372, 1989.
- Ben-hur E., Rosenthal I.**
The phtalocyanines: a new class of mammalian cell photosensitizers with a potentiel for cancer phototherapy. *Int. J. Radiat. Oncol.*, 45, 145-147, 1985.
- Ben-hur E., Rosenthal I.**
Photosensitization of chinese hamster cells by water-soluble phtalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 43, 615-619, 1986.
- Ben-hur E., Fujihara T., Suzuki F., Elkind M.M.**
Genetic toxicology of the photosensitization of Chinese Hamster cells by phtalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 45, 227-230, 1987.
- Benson R.C.**
Laser photodynamic therapy for bladder cancer. *Mayo. Clin. Proc.*, 61, 859, 1986.
- Benstead K., Moore J.V.**
The effect of fractionation of light treatment on necrosis and vascular function of normal skin following photodynamic therapy. *Br. J. Cancer*, 58, 301-305, 1988.
- Berenbaum, M.C.**
Interactions of biologically active agents. *Adv. Cancer Res.*, 35, 269-335, 1981
- Berenbaum M.C, Bonnett R., Scourides P.A.**
In vivo biological activity of the components of haematoporphyrin derivative. *Br. J. Cancer*, 45, 571-581, 1982.
- Berns M.W., Dahlman A., Johnson F.M., Burns R., Sperling D., Guiltinan M., Siemens A., Walter R., Wright W., Hammer-Wilson M., Wile A.**
In vitro cellular effect of hematoporphyrin derivative. *Cancer Res.*, 42, 2325-2329, 1982.

Bezdetnaya L., Zeghari N., Barberi-Heyob M., Merlin J.L., Potapenko A., Guillemin F.

Quantum yields of photodegradation of protoporphyrin IX in solution, luminescent, spectrophotometric and biological testing of photobleaching. *SPIE*, 2325, 248-258, 1994.

Bjorkman D.J., Wades S., Brigham E.J., Peterson B.J., Straight R.C.
Fluorescence localization of early colonic cancer in the rat by haematoporphyrin derivative. *Laser Surg. Med.*, 11, 263-270, 1991.

Böhmer R.M., Morstyn G.

Uptake of hematoporphyrin derivative by normal and malignant cells, effect of serum, pH, temperature and cell size, *Cancer Res.*, 45, 5328-5334, 1985.

Bonett R., Berenbaum M. C.

In porphyrin sensitization (edited by D. Kessel and T.J. Dougherty), 241-250. *Plenum Press*, New York, 1983.

Boyle D.G., Potter W.R.

Photobleaching of Photofrin II as mean of eliminating of skin photosensitivity. *Photochem. Photobiol.* 46, 997-1001, 1987.

Brault D.

Physical chemistry of porphyrins and their interactions with membranes, the importance of pH. *J. Photochem. Photobiol.*, B,6, 79-86, 1990.

Brown S.B., Shillcock M., Jones P.

Equilibrium and kinetic studies of the aggregation of porphyrins in aqueous solution. *Biochem. J.*, 153, 279-285, 1976.

Brown S.G., Tralau C.J., Coleridge-Smith P.D., Akdemir D., Wienam T.J.

Photodynamic therapy with porphyrin and phtalocyanine sensitization, Quantitative studies in normal rat liver. *Br.J. Cancer*, 54, 43-52, 1986.

Bruce R.A. Jr, McCaughan J.S.

Lasers in ureal melanoma. *Ophthalm. Clin. N. America*, 2,597, 1989.

Byrne C.J., Morshallsay L.V., Ward A.D.

The structure of the active material in hematoporphyrin derivative. *Photochem. Photobiol.*, 46, 575, 1987.

Candide C., Reyftmann J.P., Santus R., Mazière J.C. Morlière P., Goldstein S.

Modification of e- amino group of lysines, cholesterol oxidation and oxidized lipid-apoprotein cross-link formation by porphyrin-photosensitized oxidation of human low density lipoproteins. *Photochem. Photobiol.* 48, 137-146, 1988.

Cao E.H, Fan X.J., Chi S.J., Wang Y.X.

Hematoporphyrin derivative photosensitization and cellular fluorescent photoproduct formation. *J. Photochem. Photobiol.*, B, 2, 503-513, 1988

Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F, Minna J.D., Mitchell J.B.

Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay, assesment of chemosensitivity testing. *Cancer. Res.*, 47, 936-942, 1987 .

Christensen T., Sandquist T., Feren K., Waksvik H., Moan J. Retention and photodynamic effects of haematoporphyrin derivative in cells after prolonged cultivation in the presence of porphyrin. *Br. J. Cancer*, 48, 35-43, 1983.

Corti L., Tomio L., Maluta S., Iannone T., Calzavara F.
Photodynamic therapy in gynecological cancer. *Lasers Med. Sci.*, 4, 155, 1989.

Courtice F.C.
The origin of lipoprotein in lymph. in *Lymph and Lymphatic System*, Meyerson H.S., (Edited by Charles C. Thomas), Springfield, IL, p 89, 1963.

Cowled P., Forbes I.J.
Photocytotoxicity in vivo of haematoporphyrin derivative components. *Cancer Lett.* 28, 111-118, 1985.

Cubbedu R., Ramponi R., Bottioli G.
Disaggregating effects on hematoporphyrin derivative in the presence of surfactants at different concentrations, temperature dependence. *SPIE proc.* vol 701, 1987.

Dahlman A., Wile A.G., Burns R.G., Mason G.R., Johnson F.M., and Berns W.
Laser photoradiation therapy of cancer. *Cancer Res.*, 43, 430, 1983.

Delaney, T.F.
Photodynamic therapy , theory and practice, 32nd annual scientific meeting, american society for therapeutic radiology and oncology, 10-19, 1990.

Dellinger M., Brault D.
Uptake and retention of photofrin by cultivated human lymphoblastic cells (Reh6), preferential affinity of the cells for a minor component demonstrated by normal phase chromatography. *Photochem. Photobiol.*, 55, 587-594, 1992.

Dellinger M., Vever-Bizet C., Brault D., Delgado O., Rosenfeld C.
Cellular uptake of hydroxyethylvinyldeuteroporphyrin (HVD^o and photoinactivation of cultivated human leukemia (Reh6) cells. *Photochem. Photobiol.*, 43, 639-647, 1986.

Denekamp J.S., Hill S.A., Hobson B.
Vascular occlusion and tumor cell death. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 19, 271-275, 1983.

Diamond, I., Granelli, S.G., McDonough, A.F., Nielsen, S., Wilson C.B., Jaenicke, R. photodynamic therapy of malignant tumours. *Lancet*, 2, 1175, 1972.

Diebold S.
Contribution à la définition d'une dosimétrie laser en thérapie photodynamique anti-cancéreuse, protocoles expérimentaux, mesures automatisées, modélisation associée. *Thèse de doctorat INPL*, Avril 1991.

Dietel W., König K., Zenkevich E.
Photobleaching of HpD fluorescence and formation of photoproducts in vivo and in solutions, *Lasers Life Sci*, 3, 197-203, 1990.

Dillon J., Kennedy J.C., Pottier H.R., Roberts J.E.
In vitro and in vivo protection against phototoxic side effects of photodynamic therapy by radioprotective agents WR-2721 and WR-77913. *Photochem. Photobiol.* 48, 235-238.

Dougherty T.J., Boyle D.G., Weishaupt K.R., Henderson B.W., Potter R., Bellnier A., Wityk K.E.

In porphyrins photosensitization (edited by Kessel and Dougherty T.J.), 3-15, Plenum Press, New York.

Dougherty T.J., Grindey G.B., Weishaupt K.R., Boyle D.

Photoradiation therapy II. *J. Natl. Cancer Inst.*, 55, 115-120, 1975.

Dougherty T.J., Potter W.R., Weishaupt K.R.

The structure of the active component of hematoporphyrin derivative. In porphyrin localization and treatment of tumors (edited by Doiron D.R. et al. Gomer C.J.), 301-314, Alan R., Liss Inc, New York, 1984.

Dougherty, T.J.

Photosensitization of malignant tumors. *Sem. Surg. Oncol.*, 2, 24, 1986.

Dougherty T.J.

Photosensitizers, therapy and detection of malignant tumors. *Photochem. Photobiol.* 45, 879-889, 1987 (a).

Dougherty T.J., Mang T.S.

Characterization of intra-tumoral porphyrin following injection of haematoporphyrin derivative or its purified component. *Photochem. Photobiol.*, 46, 67-70, 1987 (b).

Dougherty T.J., Cooper M.T., Mang T.S.

Cutaneous phototoxic occurrences in patients receiving Photofrin. *Lasers Surg. Med.* 10, 485-488, 1990.

Dubbelman T., De Bruijne A., Van Steveninck J.

Photodynamic effects of protoporphyrin on red blood cell deformability. *Biochem. Biophys. Commun.*, 77, 811-817, 1977.

Edell E.S., Cortese D.A.

Bronchoscopic phototherapy with hematoporphyrin derivative for treatment of localized bronchogenic carcinoma, A 5 year experience. *Mayo Clin. Proc.*, 62, 8-14, 1987.

Emanuel N.M.

Kinetics of experimental tumor processes. *Nauka Moscow*, 1977. (en russe)

Evans S., Matthews W., Perry R., Fraker D., Norton J., Pass H.I.

Effect of photodynamic therapy on tumor necrosis factor production by murine macrophages. *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 34-39, 1990.

Farhataziz A., Rodgers M.A.J.

Radiation Chemistry. Principles and applications. VCH Publishers, Inc., New York 1987.

Feldman G.B., Knapp R.C., Order S.E.

The role of lymphatic obstruction in the formation of ascites in murine ovarian carcinoma, *Cancer Res.*, 46, 6387, 1986.

Ferrando R., Notter D., Stökel L., Azzi V., Labrude P., Vigneron C.

Is skin permeable to hematoporphyrin derivative? *Lasers Med. Sci.*, 6, 123, 1991.

Figge F.H.J., Weiland G.S., Manganiello L.O.J.

Cancer detection and therapy. Affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 68, 640-641, 1948.

Fingar V.H., Henderson B.W.

Drug and light dose dependence of photodynamic therapy, A studie of tumoral and normal tissue response. *Photochem. Photobiol.* 46, 837-841, 1987.

Fingar V.H., Mang T.S, Henderson B.W.

Modification of photodynamic therapy-induced hypoxia bu Fluosol-DA (20%) and carbogen breathing in mice. *Cancer Res.* 48, 3350-3354, 1988.

Fingar V.H., Potter W.R, Henderson B.W.

Drug and light dose dependence of photodynamic therapy, A studie of tumoral cell clonogenicity and histologic changes. *Photochem. Photobiol.* 45, 643-650, 1987

Fingar V.H., Wieman T.J.

Studies on the mechanisms of photodynamic therapy induced tumor destruction . Proceeding SPIE Conference "Photodynamic therapy, Mechanisms II" 1203, 168-177, 1990.

Flohe L.

Gluthatione peroxidase brought into focus. In Free radicals in biology, (edited by W. A. Pryor), 5, 223-253, Academic press, Inc., New-York, 1982.

Folkman J.

How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue?, G.H.A. Clowes Memorial Award Lecture, *Cancer Res.*, 46, 467, 1986.

Foultier M.T., Patrice T., Praloran V., Robillard N., Le Bodic L.

Influence of hematoporphyrin derivative concentration, incubation time, temperature during incubation and laser dose fractionation on photosensitivity of normal hemopoietic progenitors or leukemic cells. *Biochimie*, 71, 819-825, 1989.

Gàl D.

Effect of photosensitizers in chemical and biological processes : the MTO mechanism in photodynamioc therapy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 186, 1032-1036, 1992.

Gervais P., Besner J.G, Band P., Mailhot S., Leclaire R., Houle J.M.

Extraction tissulaire de différents dérivés de l'hématoporphyrine utilisés en oncologie clinique et expérimentale. *Ann. pharm.franç.*, 41, 159-165, 1983.

Gibson S.J., Murant R.S, Chazen M.D., Kelly M.E., Hilf R.

In vitro photosensitization of tumour cell enzymes by photofrin II administrated in vivo. *Br. J. Cancer*, 59, 47-53, 1989.

Gibson S.L., VanDerMeid K.R., Murant R.S., Raubertas R.F., Hilf R.

Effects of various photoradiation regimens of the antitumor efficacy of p^hotodynamic therapy for R3230AC mammary carcinomas. *Cancer Res.*, 50, 7236-7241, 1990.

Giniunas L., Rotomskis R., Smilgevicius V., Piskarskas A., Didziapetriene J., Bloznelyte L., Griciute L.

Activity of haematoporphyrin derivative photoproduct in photodynamic therapy. *Lasers. Med. Sci*, 6, 425-428, 1991.

Girotti A.

Protoporphyrin-sensitized photodamage in isolated membranes of human erythrocytes. *Biochem.* 18, 4403-4411, 1979.

Girotti A.W.

Photodynamic lipid peroxydation in biological systems. *Photochem. Photobiol.* 51, 497-509, 1990.

Gomer C.J., Ferrario A.

Tissue distribution and photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 in a mouse tumor model. *Cancer Res.* 50, 3985-3990, 1990.

Gomer C.J., Rucker N., Banerjee A., Benedict W.F.

Comparison of mutagenicity and induction of sister chromatid exchange in Chinese hamster cells exposed to hematoporphyrin derivative photoradiation, ionizing radiation, or ultraviolet radiation. *Cancer. Res* 43, 2622-2627, 1983.

Gomer C.J., Rucker N., Ferrario A. et al.

Properties and applications of photodynamic therapy. *Radiat. Res.*, 120, 1-18, 1989.

Goyal G.C., Blum A., Grossweiner I.

Photosensitization of liposomal membranes by hematoporphyrin derivative. *Cancer Res.* 43, 5826-5830, 1983.

Graschew G., Shopova M., Anastassova G., Chakarova A.

Light dose fractionation versus single-dose irradiation in photodynamic therapy of tumours. *Laser Med. Sci.*, 3, 173-177, 1988.

Grossweiner L. I.

Optical dosimetry in photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.*, 6, 462-466, 1986.

Grossweiner L. I., Patel A. S., Grossweiner J.B.

Photochem. Photobiol. 36, 159-167, 1982.

Grossweiner, L.I., Hill, J.H., and Lobraico, R.V.

Photodynamic therapy of head and neck squamous cell carcinoma, optical dosimetry and clinical trial. *Photochem. Photobiol.*, 46, 911, 1987.

Guillemin F., Yvroud E., Merlin J.L., Bolotina-Bezdetnaya L., Lignon D., Zeghari N., Rezzoug H., Barberi-Heyob M., Meunier-Reynes A., Granjon Y., Müller L., Jaffry F., Notter D., Vigneron C.

Optical instrumentation suitable for real-time dosimetry during photodynamic therapy, in *optical biopsies* R. Cubbedu, S. Mordon, Svanberg K.eds, SPIE 2627,1995.

Gullino P.M. and Grantham F.H.

The influence of the host and neoplastic cell population on the collagen content of a tumor mass, *Cancer Res.*, 23, 648, 1963.

Hayata Y., Kato H., Konaka C., Amemiya R, Ono J., Ogawa I., Kinoshita K., Sakai H., Takahashi H.

Photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative in early end stage 1 lung cancer. *Chest*, 90, 768, 1984.

Hayata Y., Kato H., Okitsu H., Kawaguchi M., Konaka C.

Photoradiation therapy with hematoporphyrin derivative in the cancer of the upper gastrointestinal tract. *Sem. Surg. Oncol.*, 1, 1, 1985.

He X.Y., Sikes R.A., Chung L.W.A., Thomsen S., Jaques S.L.

Photodynamic therapy induces programmed cell death of prostatic cancer cell, A comparison with the results in breast and lung cancer cells, *SPIE proc* 1881, 40, 1993.

Henderson B, Fingar V.H.

Relationship of tumor hypoxia and response to photodynamic treatment in an experimental mouse tumor. *Cancer Res.*, 47, 3110-3114, 1987.

Henderson B., Fingar V.H.

Oxygen limitation of direct cell killing during photodynamic treatment in vitro, Comparison to ionizing radiation. *Radiat. Res.* 108, 196-205, 1989.

Henderson B.W., Donovan J.M.

Release of prostaglandin E2 from cells by photodynamic treatment in vitro. *Cancer Res.*, 49, 6896-6900, 1989.

Henderson B.W., Dougherty T.J.

How does photodynamic therapy works? *Photochem. Photobiol.*, 55, 145-157, 1992.

Hilf R., Leakey P.B., Sollot S.J., Gibson S.L.

Photodynamic inactivation of R3230AC mammary carcinoma in vitro with hematoporphyrin derivative, effect of dose, time Christensen T., Sandquist T., and serum on uptake and phototoxicity. *Photochem. Photobiol.*, 37, 633, 1983.

Hilf R., Murant R.S., Narayanan U., Gibson S.L.

Relationship of mitochondrial function and cellular adenosine triphosphate levels to hematoporphyrin derivative-induced photosensitization in R3230AC mammary tumors. *Cancer Res.*, 46, 211-217, 1986.

Hisazumi H., Misaki T., and Miyoshi N.

Photoradiation therapy of bladder tumors. *J. Urol.*, 130, 685, 1983.

Horsman M.R., Winther J.o.

Vascular effects of photodynamic therapy in an intraocular retinoblastoma-like tumour. *Acta Oncol.* 28, 693-697, 1989.

Jain R.K.

Transport of molecules in the tumor interstitium, a review. *Cancer Res.*, 47, 3039-3051, 1987

Jain R.K.

Determinants of tumor blood flow/ A review. *Cancer Res.*, 48, 2641-2658, 1988.

Jaques L.S., Joseph R., Gofstein G.

How photobleaching affects dosimetry and fluorescence monitoring of PDT in turbid media. Optical methods for tumor treatment and detection *SPIE*, 1881, 168-179, 1993

Jonusauskas G., Kapociute R., Rotomskiene J.

Effect of light fluence on absorption spectra of hematoporphyrin diacetate in solution. Abstract of 2nd congress of the European Society of Photobiology, Italy, 119, 1987.

Jori G., Reddi E., Rossi E., Cozzani E., Tomio P.L., Zoraf Z.B., Pizzi G.B., Calzavara F.

Med. Biol. Environ. 8, 141-154, 1980.

Jori G., Tomio L., Reddi E., Corti L., Zorat P.L., Calzavara F.

Preferential delivery of liposomes-incorporated porphyrins to neoplastic cells in tumor-bearing rats. *Br. J. Cancer*, 7, 309, 1983.

Kamalov V.F., Stepanova N.V., Chernyaeva E.B., Chikishev Yu A.

Selective effect of laser radiation on cancer cells and laser spectroscopy of the cell. *Sov. J. Quantum Electron*, 15, 1319-1334, 1985.

- Kaye, A.H., Morstyn, G., Brownbill, D.**
Adjuvant high-dose photoradiation therapy in the treatment of cerebral glioma, a phase 1-2 study. *J. Neurosurg.*, 67, 500, 1987.
- Kelly J.F., Snell M.E.**
Hematoporphyrin derivative, A possible aid in the diagnosis and therapy of carcinoma of the bladder. *J. Urol* 155, 150-151, 1976.
- Kennedy, J.C., Pross, D.C., Pottier, R.H.**
Topical application of 5-aminolevulinic acid selectively induces phototoxic concentrations of protoporphyrin IX in actinic keratoses, primary basal cell and squamous cells carcinomas, and transdermal secondaries of breast carcinoma. *International Photodynamic Association proc*, Buffalo, New York, 1990.
- Kerr JFR., Searle J., Harmon B.V., Bishop C.J.**
Apoptosis. In perspectives on mammalian cell death. (edited by C.S. Potten). Oxford, *Oxford University Press*, 93-128, 1987.
- Kessel D. and Chou T.H.**
Tumor-localizing components of the porphyrin preparation of hematoporphyrin derivative. *Cancer. Res.* 43, 1994-1999, 1983.
- Kessel D.**
Porphyrin lipoprotein association as a factor in porphyrin localization. *Cancer Lett.* 33, 183-188, 1986 (a).
- Kessel D.**
Tumor localization and photosensitization by a chlorinporphyrin ester. *Cancer Res.* 46, 2248-2251, 1986 (b).
- Kessel D.**
Proposed structure of the the tumor-localizing fraction of HpD (hematoporphyrin derivative). *Photochem. Photobiol.* 44, 193-196. 1986 (c).
- Kessel D.**
Sites of photosensitization by derivative of hematoporphyrin. *Photochem. Photobiol.* 44, 489-493, 1986 (d).
- Kohen E., Kohen C., Reyftmann J.P., Morlière P., Santus R.**
Microspectrofluorimetry of fluorescent photoproducts in photosensitized cells. *Biochim. Biophys. Acta* 805, 332-336, 1984.
- König K., Schneckenburger H., Rück A., Steiner R.**
In vivo photoproducts formation during PDT with ALA-induced endogenous porphyrin. *J. Photochem. Photobiol.*, B, 18, 287-290, 1992.
- König K., Wabnitz H., Dietel W.**
Variation in the fluorescence decay properties of haematoporphyrin derivative during its conversion to photoproducts. *J. Photochem. Photobiol.*, B, 8, 103-11, 1990.
- Korbelik M., Hung J.**
Cellular delivery and retention of photofrin II, The effects of interaction with human plasma proteins. *Photochem. Photobiol.* 53, 501-510, 1991.
- Korbelik M.**
Cellular delivery and retention of photofrin , III. Role of plasma proteins in photosensitizer clearance from cells. *Photochem. Photobiol.*, 57, 846-850, 1993.

Krieg M., Whitten D.

Self sensitized photo-oxydation of protoporphyrin IX and related porphyrins in erythrocyte ghosts and microemulsions, a novel photo-oxidation pathway involving singlet oxygen. *Journal of Photochemistry*, 25, 235-252, 1984.

Langlois R., Ali H., Brasseur N., Wagner J.R., Van Lier J.E.

Biological activities of phtalocyanines -IV. type II sensitized photooxidation of L-tryptophan and cholesterol by sulfonated metallo phtalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 44, 117-123, 1986.

Laukka M.A., Wang K.K., Bonner J.A.

Apoptosis occurs in lymphoma cells but not in hepatoma cells following ionizing radiation and photodynamic therapy. *Digestive Disease and Sciences*, 39, 2467-2475, 1994.

Laustriat G.

Molecular mechanisms of photosensitisation. *Biochimie*, 1986, 68, 771-778.

Laws, E.R., Jr., Cortese, D.A., Kinsey, J.H., Eagen, R.T., Anderson, R.E.

Photoradiation therapy in the treatment of malignant brain tumors, A phase I (feasibility) study. *Neurosurgery*, 9,672, 1981.

Leengood E.

PhD thesis Erasmus University, Rotterdam, The Netherlands, may 1993.

Lemaire J.

Une introduction élémentaire à la photochimie. in "*Eléments de photochimie avancée*", (edited by Courtot P), Brest , 13-39, 1972.

Lignon D

Diffuseurs implantables en thérapie photodynamique, couplage fibre-optique-faisceau laser à angle variable. *Diplome d'ingénieur technologue*, Université de Nancy I, Juin 1990.

Lignon D.

Elaboration d'un dispositif de dosimétrie endovésicale adapté au traitement par photochimiothérapie des cancers de vessie, optique, électronique, capteurs, traitement du signal, modélisation associée. *Diplôme d'ingénieur d'état, INPL*, 1993.

Lim H.W., Parker D., Marcus A.J.

Generation of eicosanoids from mast cells exposed to protoporphyrin and irradiation. *Clin. Res.* 34, 763, 1986.

Lipson L.R., Baldes E.J., Olsen E.M.

The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J. Natl. Cancer. Inst.* 26,1-12, 1961.

Lipson L.R., Gray M.J., Baldes E.J. 1966

Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. *Proc 9th Internat. Cancer Congr.*, Tokyo, p. 393 (abstract).

Loh C.S., Bedwell J., MacRobert A.J., Krasner N., Phillips D., Bown S.G

Photodynamic therapy of the normal stomach, a comparative study between di-sulphonated aluminium phtalocyanine and 5-amonolaevulinic acid. *Br. J. Cancer*, 66, 452-462, 1992.

Ma L.W., Moan J., Berg K.

Comparison of the photobleaching effect of three photosensitizing agents, meso-tetra(m-hydroxy-phenyl)chlorin, meso-tetra(m-hydroxy-phenyl)porphyrin and photofrin during photodynamic therapy. *Lasers Med. Sci.*, 9, 127-132, 1994.

Maire E.

Analyse d'image appliquée à l'étude des récepteurs leucocytaires des antigènes de différenciation par cytofluoromicroscopie-laser. *Thèse de doctorat de l'Université de Haute Alsace*, Décembre 1994.

Mang T.S., Dougherty T.J., Potter W.R., Boyle D.G., Somer S., Moan J.

Photobleaching of porphyrins used in photodynamic therapy and implications for therapy. *Photochem. Photobiol.* 45, 501-506, 1987.

Mang T.S. and Wieman T.J.

Photodynamic therapy in the treatment of pancreatic carcinoma, dihematoporphyrin ether uptake and photobleaching kinetics *Photochem. Photobiol.* 46, 853-858, 1987.

Manyak M.J., Smith P.D., Harrington F.S., Steinbert S.M., Glastein E., Russo A.

Protection against dihematoporphyrin ether sensitivity. *Photochem. Photobiol.* 47, 823-830, 1988.

Marhews-Roth M.

Porphyrin photosensitization and carotenoid protection in mice; in vitro and in vivo studies. *Photochem. Photobiol.*, 40, 63-67, 1984.

Marijnissen J.P.A., Jansen H., Star W.M.

Treatment system from whole bladder wall photodynamic therapy with in vivo monitoring and control of light dose rate and dose. *J. Uro.* 142, 1351-1355, 1989.

Marijnissen J.P.A., Star W.M., Vesteeg J.A.C.

Pilot study on the interstitial HPD-PDT in rats bearing solid mammary carcinoma or rhabdomyosarcoma. In: Jori J., Perria C., editors. Photodynamic therapy of tumours and other diseases. *Padova, Liberia Progetto*, 387-390, 1985.

Marijnissen J.P.A., Star W.M.

Quantitative light dosimetry in vitro and in vivo. *Lasers Med. Sci.* 2, 235-241, 1987.

Marijnissen J.P.A., Vesteeg J.A.C., Star W.M.

Tumor and normal tissue response to interstitial photodynamic therapy of the rat R-1 rhabdomyosarcoma. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 22, 263-272, 1992.

Matsuma Y., Maeda H.

A new concept of macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy, mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and antitumor agent Smancs, *Cancer Res.*, 46, 6387, 1986.

Matsuura T., Inoue K., Ranade A.C., Saito I.

Photochem. Photobiol., 31, 23, 1980.

Merlin JL, Azzi S, Lignon D, Ramacci C, Zeghari N, Guillemin F

MTT assays allow a quick and reliable measurement of the response of human tumour cells to photodynamic therapy. *Eur J. Cancer*, 28A, 8/9, 1452-1458, 1992

Merlin JL, Meunier-Reynes A, Zeghari N, Ramacci C, Lignon D, Azzi V, Diebold S, Notter D, Labrude P, Granjon Y, Vigneron C, Yvroud E, Guillemain F.

Thérapie photodynamique , études précliniques in vitro et in vivo sur cellules d'adénocarcinome de côlon humain (HT-29). *Bull Cancer*, 79, 615, 1992.

Merlin JL, Zeghari N, Griffon G, Ramacci C, Lignon D, Guillemain F.
Influence of light fractionation on the photodynamic activity of hematoporphyrin derivative on human tumor cell lines. *Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers*, Excerpta Medica, International Congress Series 1011. Spinelli P, Dal Fante M, Marchesini R, editors. Elsevier Sciences Publishers, Amsterdam, 503-507, 1992

Merlin, J.L.

Concepts of synergism and antagonism. *Anticancer Res.*, 14, 2315-2330, 1994

Meunier-Reynes A., Diebold S, Lignon D., Granjon Y., Guillememin F.
Light dosimétrie in vivo interstitial photodynamic therapy of human tumors. *SPIE*, 1525, 177-185, 1991.

Meunier A.

La thérapie photodynamique. Réflexions à partir de la littérature et de l'expérience clinique de l'Unité de Recherche en Thérapie Photodynamique de Nancy. *Thèse de Médecine, Université de Nancy I*, Septembre 1992.

Mew D., Wat C.K., Towers G.H.N., Levy J.G.

Photoimmunotherapy, treatment of animal tumors with tumor-specific monoclonal antibody-hematoporphyrin conjugates. *J. Immunol*, 130, 1473-1477, 1983.

Moan J., Christensen T.

Photodynamic inactivation of cancer cells in vitro effect of irradiation temperature and dose fractionation. *Cancer Letters*, 6, 331-335, 1979.

Moan J., Smedshammer L., Christensen T.

Photodynamic effect of human cells exposed to light in the presence of hematoporphyrin. pH effects, *Cancer Lett.*, 9, 327-332, 1980.

Moan J., Sommer S.

Fluorescence and absorption properties of the components of hematoporphyrin derivative. *Photochem. Photobiol.*, 3, 93-103, 1981.

Moan J., Christensen T., Sommer S.

The main photosensitizing components of hematoporphyrin derivative. *Cancer Lett.*, 15, 161-166, 1982.

Moan J., Johannessen J.V., Christensen T., Espevik T., McGhie J.B.
Porphyrin-sensitized photoinactivation of human cells in vitro. *Am. J. Pathol.* 109, 184-192, 1982.

Moan J., Sommer S.

Uptake of the components of hematoporphyrin derivative by cells and tumors. *Cancer Lett.*, 21, 167-174, 1983.

Moan J.

Fluorescence of porphyrins in cells. in *Porphyrins in Tumor Therapy* (edited by Andreoni A. and Cubbedu R.), 109-124. Plenum Press, New York, 1984.

Moan J.

The photochemical yield of singlet oxygen from porphyrins in different states of aggregation. *Photochem. Photobiol.* 39, 445-449, 1984.

Moan J., Christensen T., Jacobsen P.B.

Porphyrin sensitized photoinactivation of cells in vitro. in *Porphyrin Localisation and Treatment of Tumors* (edited by Doiron D.R., and Gomer C.J.) pp 91-114, Alan R. Liss, New York, 1984.

Moan J., Rimington C., Western A.,

The binding of dihematoporphyrin ether (photofrin II) to human serum albumin. *Clin. Chim. Acta.*, 145, 227-236, 1985.

Moan J.

Effect of bleaching of porphyrin sensitizers during photodynamic therapy. *Cancer Lett.*, 33, 45-53, 1986.

Moan J., Peng Q., Evenson J.F., Berg K., Western A., Rimington C.

Photosensitizing efficiencies, tumor and cellular uptake of different photosensitizing drugs relevant for photodynamic therapy of cancer. *Photochem. Photobiol.* 46, 713-721, 1987.

Moan J.

A change in the quantum yield of photoinactivation of cells observed during photodynamic treatment, *Lasers. Med. Sci* 3, 93-97, 1988.

Moan J., Kessel D.

Photoproducts formed from photofrin in cells. *J. Photochem. Photobiol.* B, 1, 429-436, 1988.

Moan J., Rimington C., Malik Z.,

Photoinduced degradation and modification of photofrin in cells in vitro. *Photochem. Photobiol.*, 47, 363-367, 1988.

Moan J., Berg K., Kvam E., Western A., Malik Z., Ruck A., Schneckenburger H.

Intracellular localization of photosensitizers. In *Photosensitizing Compounds, Their Chemistry, Biology and Clinical Use*, pp 95-107, Wiley, Chichester, UK, 1989.

Moan J.

On the diffusion length of singlet oxygen in cells and tissues. *J. Photochem. Photobiol.*, B, Biol, 6, 343-344, 1990.

Morgan A.R., Garbo G.M., Keck R.W., Eriksen L.D. Selman S.H.

Metalloporphyrins and light, Effect on transplantable rat bladder tumors and murine skin. *Photochem. Photobiol.* 51, 589-592, 1990.

Moan J. and Berg K.

The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* 53, 549-553, 1991.

Mosmann, T.

Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. *J. Immunol. Methods*, 65, 55-63, 1983.

Mosyenko V.S., Bullach A.D.

Polarographic determination of oxygen in biological entities, *Kiev Nauka Dumka*, 191-200, 1974 (en russe).

Muller PJ, Wilson B.C.

Photodynamic therapy of malignant primary brain tumors , clinical effects, post-operative ICP, and light penetration of the brain. *Photochem Photobiol.* 46, 929-935, 1987.

Mullooly V.M., Abramson A.L., Shikowitz M.J.

Dihematoporphyrin ether-induced photosensitivity in laryngeal papilloma patients. *Lasers Surg. Med.*, 10, 349-356, 1990.

Murphree A.L., Cote M., Gomer C.J.

The evolution of photodynamic therapy techniques in the treatment of intraocular tumors. *Photochem. Photobiol.*, 46, 919,1979.

Nelson S.J., Fairshter R.D., Berns M.W.

Long term survival of a lung cancer patient treated with photodynamic therapy. *Lasers Surg. Med.* 10, 208-210, 1990.

Nelson S.J., Liaw L.H., Orenstein A., Roberts W.G., Berns M.W.

Mechanisms of tumor destruction following photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative, chlorin and phtalocyanine. *J. Natl. Cancer Inst.* 80, 1599-1605, 1988.

Notter D., Ruffin M., Azzi V., Carasso S., Labrude P., Vigneron C.

Attempt at increasing hæmatoporphyrin derivative diffusion for topical use in photodynamic therapy. *Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers*, (edited by Dal Fante M. and Marchesini), Elsevier, Spinelli P., 958-961, 1992.

Nseyo U.O., Whalen R.K., Duncan M.R., Berman B., Lundhal S.L.

Urinary cytokines following photodynamic therapy for bladder cancer, A preliminary report. *Urol.* 36, 167-171, 1990.

Oleinick NL., Agarwal M.L., Berger N.A.

Signal transduction and metabolic changes during tumor cell apoptosis following phtalocyanine-sensitized photodynamic therapy. *SPIE Proc.* 1881, 1-10, 1993.

Pass, H.I., delaney, T.F., Smith, P.D., Bonner, R., and Russo,

A.Bronchoscopic phototherapy at comparable dose rate, Early results. *Ann. Torac. Surg.*, 47, 693, 1989.

Patterson M.S., Madsen S.J., Wilson B.C.

In vivo test of the concept of photodynamic threshold dose in normal rat liver photosensitized by aluminium chlorosulfonated phtalocyanine. *Photochem. Photobiol.* 51, 343-349, 1990.

Patterson M.S., Wilson B.C., Wyman D.G.

The propagation of optical radiation in tissue, I, models of transport and their application. *Lasers Med. Sci.* 6, 155-168, 1991.

Patterson M.S., Wilson B.C., Wyman D.G.

The propagation of optical radiation in tissue, II, optical properties of tissues and resulting fluence distributions. *Lasers Med. Sci.*, 6, 379-390, 1991.

Peng Q., Farrants G.W., Madslien K., Bommer J.C., Moan J., Danielson H.E., Nesland J.M.

Subcellular localization, redistribution and photobleaching of sulfonated aluminium phtalocyanines in human melanoma cell line. *Int. J. Cancer.* 49, 290-295, 1991.

Poletti A.S., Murgia M., Pasqua A., Reddi E., Jori G.

Photophysical and photosensitizing properties of photofrin II. In *Porphyrins in Tumor Phototherapy* (edited by A. Andreoni and R. Cubeddu), pp. 37-43, Plenum Press, New York, 1984.

Policard A.

Etudes sur les aspects offerts par des tumeurs experimentales examinées à la lumière de Woods. *C.R. Hebdomadaires Soc. Biol.* 91, 1422-24, 1924.

Potter W.R., Mang S., Dougherty T.J.

The theory of photodynamic therapy dosimetry, consequence of photodestruction of sensitizer. *Photochem. Photobiol.*, 46, 97-101, 1987.

Potter W.R., Mang S.

Photofrin 2 levels by in vivo fluorescence photometry. In *Porphyrin Localisation and Treatment of Tumors* (edited by Doiron D.R., and Gomer C.J.) pp 177-186, Alan Liss, New York, 1984.

Pottier R., Truscott T.G.

The photochemistry of haematoporphyrin and related systems. *Int. J. Radiat. Biol.*, 50, 421-452, 1986.

Proffio A.

Laser excited fluorescence of haematoporphyrin derivative for diagnostic of cancer; *T. Quantum Electronics*, 20, 1502-1506, 1984.

Proffio A.E., Doiron D.R.

Transport of light tissue in photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 46, 591-599, 1987.

Proffio A.E., Balchum J.O., Carstens F.

Background substrates for fluorescence imaging. *Med. Phys.*, 13, 717-721, 1986.

Raab c.

Über die wirkeng fluoreszirenden stoffe aninfusoria. *Z. Biol.* 39, 524-526, 1900.

Ramakrishnan N., Oleinick N.L., Clay M.E., Horng M.F., Antunez A.R., Evans H.H.

DNA lesions and DNA degradation in mouse lymphoma L5178Y cells after photodynamic treatment sensitized by chloroaluminium phthalocyanine. *Photochem. Photobiol.* 50, 373-378, 1989.

Reddi E., Lo Castro G., Biolo R., Jori G.

Pharmacokinetic studies with Zn(II)-phtalocyanin in tumour-bearing mice. *Br. J. Cancer* 56, 597-600, 1987.

Reddi E., Richelli F., Jori G.

Interaction of human serum albumin with hematoporphyrin and its Zn^{2+} and Fe^{3+} derivatives. *Int. J. Peptide Protein Res.*, 18, 402-408, 1981.

Reed M.W.R., Miller F.N., Wieman T.J., Tseng M.T., Pietsch C.G.

The effect of photodynamic therapy on the microcirculation. *J. Surg. Res.* 45, 452-459, 1988.

Reed M.W.R., Schuschke D.A., Ackermann D.M., Harty J.I., Wieman T.J., Miller F.N.

The response of the rat urinary bladder microcirculation to photodynamic therapy. *J. Urol.* 142, 865-868, 1989.

Reyftmann J.P., Kohen E., Morlière P., Santus R., Kohen C., Mangel W.F., Dubertret L., Hirschberg G.

A microspectrofluorometric study of porphyrin -photosensitized single living cells. I, membrane alterations. *Photochem. Photobiol.* 44, 461-469, 1986.

Reyftmann J.P., Morlière P., Goldstein S., Santus R., Dubertret L., Lagrange D.

Interaction of human serum low density lipoproteins with porphyrins, a spectroscopic and photochemical study. *Photochem. Photobiol.* 40, 721-729, 1984.

Rezzoug H, Merlin JL, Lignon D, Ramacci C, Marchal S, Bolotine L, Zeghari N, Yvroud E, Guillemin F

Evaluation in vitro de l'activité photodynamique de la méso-tétra (m-hydroxyphényl) chlorine (mTHPC). *Bull Cancer*, 82, 6, 457, 1995.

Rezzoug H, Meunier A, Merlin JL, Lignon D, Zeghari N, Yvroud E, Guillemin F.

Evaluation de la profondeur de pénétration de la lumière utilisée en thérapie photodynamique, in vivo sur des xénogreffes tumorales. *Bull Cancer*, 81, 553, 1994.

Richard P., Blum A., Grossweiner L.I.

Hematoporphyrin photosensitization of serum albumin and subtilisin BPN. *Photochem. Photobiol.* 37, 287-291, 1983.

Ris H.B., Altermati H.J., Nachbur B., Stewart J.C.M., Wang Q., Lim C.K., Bonnett R., Althaus U.

Effect of drug-light interval on photodynamic therapy with meta-tetrahydroxyphenylchlorin in malignant mesothelioma. *Int. J. Cancer*, 55, 245-249, 1993.

Ris H.B., Altermati H.J., Nachbur B., Stewart J.C.M., Wang Q., Lim C.K., Bonnett R., Althaus U.

Photodynamic therapy with m-Tetrahydroxyphenylchlorin in vivo, optimisation of the therapeutic index. *Int. J. Cancer*, 55, 245-249, 1993.

Roberts W.G., Liaw L-H., Berns M.W.

In vitro photosensitization II. An electron microscopy study of cellular destruction with mono-L-aspartyl chlorin e6 and photofrin II. *Lasers Surg. Med.* 9, 102-108, 1989.

Roberts W.G., Smith K.M., McCullough J.L., Berns M.W.

Skin photosensitivity and photodestruction of several potential photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.* 49, 431-438, 1989.

Rodgers M. A. J., Reddi E., Jori G., Spikes J. D.

Environmental influences on the photoproperties of hematoporphyrin and coproporphyrin, a laser flash photolysis examination. Abstract from , *International symposium on porphyrins in tumor phototherapy*. Milano, 1983.

Rosenthal I.

Phtalocyanines as photodynamic sensitizers. *Photochem. Photobiol.* 53, 859-870, 1991.

Rotomskiene J. Kapociute R., Rotomskis R., Jonusauskas G., Szito T., Nizhnik A.

Light induced transformations of HP-diacetate HP. *J. Photochem. Photobiol.* B,2, 373-379, 1988.

Rück A., Hilderbrandt C., Köllner H., Shneckenburger H., Steiner R.
Competition between photobleaching and fluorescence increase of photosensitizing porphyrins and tetrasulphonated chloroaluminiumphthalocyanine. *J. Photochem. Photobiol.*, 5, 311-319, 1990.

Salet C., Moreno G.
New trends in photobiology. Photosensitization of mitochondria. Molecular and cellular aspects. *J. Photochem. Photobiol.*, B, Biol, 5, 133-150, 1990.

Sandberg S., Romslo I.
Porphyrin-sensitized photodynamic damage of isolated rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Acta* 593, 187-195, 1980.

Schneckenburger H., Rück A., Bartos B., Steiner R.
Intracellular distribution of photosensitizing porphyrins measured by video-enhanced fluorescence microscopy. *J. Photochem. Photobiol.* B. 2, 355-363, 1988.

Schuitmaker J.J., Van Leengoed H.L.L.M., Van Der Veen N., Dubbelman T.M.A.R.
Laser-induced in vivo fluorescence of bacteriochlorine a, preliminary results. *Laser Med. Sci.*, 8, 39-42, 1993.

Schumaker B.P., Hetzel F.W.
Clinical laser photodynamic therapy in the treatment of bladder cancer. *Photochem. Photobiol.* 46, 899-901, 1987.

Sen P.K., Grossweiner I.
Propyl gallate protects RBC ghosts against photosensitization by hematoporphyrin derivative. *Photochem. Photobiol.* 47, 74S, 1988.

Shneckenburger H., Rück A., Bartos B., Steiner R.
Intracellular distribution of photosensitizing porphyrins measured by video-enhanced fluorescence microscopy. *J. Photochem. Photobiol.*, 2, 355-363, 1988.

Shulok J.R., J.E. Klaunig, Selman S.H., Schafer P.J., Goldblatt P.J.
Cellular effects of hematoporphyrin derivative photodynamic therapy on normal and neoplastic rat bladder cells. *Am. J. Pathol.* 122, 277-283, 1986.

Shulok J.R., Wade M.H., Chi-Wei Lin.
Subcellular localisation of hematoporphyrin derivative in bladder tumor cells in culture. *Photochem. Photobiol.* 51, 451-457, 1990.

Shulyakovskaya T., Sümegi L., Gál D.
In vivo experimental studies on the role of free radicals in photodynamic therapy. I. Measurements of the steady state concentration of free radicals in tumor tissues in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2, 581-587, 1993.

Smith A., Neuschütz T.
Haematoporphyrin and OO'-diacetylhaematoporphyrin binding by serum and cellular proteins. *Biochem. J.*, 214, 503-509, 1983.

Smith G.J.
The effects of aggregation on the fluorescence and the triplet state of hematoporphyrin. *Photochem. Photobiol.* 41, 123-126, 1985.

Smith K.M., Brown S.B., Troxler R.F., Lai J.J.
Photochem. Photobiol. 36, 147, 1982.

Specht K.G., Rodgers M.A.

Depolarisation of mouse myeloma cell membranes during photodynamic action. *Photochem. Photobiol.* 51, 319-324, 1990.

Spikes J.D.

Quantum yields and kinetics of the photobleaching of hematoporphyrin, Photofrin II, Tetra(4-sulfonatophenyl)-Porphyrine, porphyrine and uroporphyrin. *Photochem. Photobiol.*, 55, pp 797-808, 1992.

Spikes J. D., Jori G.

Photodynamic therapy of tumours and other diseases using porphyrins. *Lasers in Medical Science* 2, 3-15, 1987.

Star W.M., Marijnissen H.P.A., Van den Berg-Block A.E., Versteeg J.A.C., Franken K.A.P., Reinold H.S.

Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. *Cancer Res.* 46, 2532-2540, 1986.

Strečkyte.G., Rotomskis R.

Phototransformation of porphyrins in aqueous and micellar media. *J. Photochem. Photobiol. B*, 18, 259-263, 1993.

Thomas J.P., Girotti A.W.

Role of lipid peroxidation in hematoporphyrin derivative-sensitized photokilling of tumor cells, protective effects of glutathione peroxidase. *Cancer Res.* 49, 1682-1686, 1989.

Thomas R.J., Abbott M., bhathal P.S., ST John D.J.B. and Morstyn G.
High dose of photoradiation of esophageal cancer. *Ann. Surgery*, 206, 193, 1987.

Tralau C.J., MacRobert A.J., Coleridge-Smith P.D., Barr H., Bown S.J.
Photodynamic therapy with phtalocyanines photosensitisation, Qualitative studies in transplantable fibrosarcoma of rats. *Br. J. Cancer.* 55, 389-395, 1987.

Tralau C.J., Young A.R., Walker N.P.J., Vernon D.I., MacRobert A.J., Brown S.B., Bown S.G.

Mouse skin photosensitivity with dihematoporphyrin ether (DHE) and aluminium sulphonated phtalocyanine (AlSPc), A comparative study. *Photochem. Photobiol.*, 49, 305-312, 1989.

Tsuchiya A., Obara N., Miwa M., Ohio T., Hayata H.

Hematoporphyrin derivative and laser photoradiation in the diagnosis and treatment of bladder cancer. *J. Urol.*, 130, 79, 1983.

Underwood J.C.E. and Carr I.

The ultrastructure and permeability characteristics of the blood vessels of transplantable rat sarcoma, *J. Pathol.* 107, 157, 1972.

Valenzo D.P.

Photomodification of biological membranes with emphasis on singlet oxygen mechanisms. *Photochem. Photobiol.* 46, 147-160, 1987.

Van Gemert J.C., Berenbaum M.C., Gijsbers G.H.M.
Wavelength and light-dose dependence in tumour phototherapy with haematoporphyrin derivative. *Br. J. Cancer*, 52, 43-49, 1985.

Van Hillegersberg R., Kort W.J., Wilson P.
Current status of photodynamic therapy in oncology. *Drugs* 48, 510-527, 1994.

Wagnieres G.
Photochimiothérapie et photodétection du cancer à l'aide de photosensibilisateurs ou de colorants fluorescents. *Thèse n° 1024, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne*, 1992

Wile A.G., Novotny J., Mason G.R., Passy V., Berns M.W.
Photoradiation therapy of head and neck cancer. *In porphyrin localisation and treatment of tumors*. Edited by D.T. Doiron, C.J. Gomer. New York, Alan R. Liss, 1984, 681.

Wilson B.C., Jeeves W.P., Lowe D.M.
In vivo and post-mortem measurements of the attenuation spectra of light in mammalian tissues. *Photochem. Photobiol.*, 42, 153-162, 1985.

Wilson B.C., Patterson M.S.
The physics of photodynamic therapy. *Phys. Med. Biol.* 36, 327-360, 1986.

Woodburn K.W., Vardaxis N.J., Hill J.S., Kaye A.H., Phillips D.R.
Subcellular localization of porphyrins using confocal laser scanning microscopy. *Photochem. Photobiol.* 54, 725-732, 1991.

Zieve P.D., Solomon H.M., Krevans J.R. The effect of hematoporphyrin and light on human platelets. I. Morphologic, functional and biochemical changes. *J. Cell. Physiol.* 67, 271-280, 1966.



Annexes

LISTE DES FIGURES

figure II.1 (p 8)	Distribution des spins électroniques dans l'état fondamental et dans l'état excité
figure II. 2 (p 9)	Représentation des états excités moléculaires électroniques : diagramme de Jablonski
figure IV.1 (p 19)	Structure chimique des porphyrines
figure IV.2 (p 19)	Structure de base des monomères
figure IV.3 (p 20)	Structure de la dihématoporphyrine éther (D.H.E)
figure IV.4 (p 21)	Structure chimique de la dihématoporphyrine ester
Figure IV.5 (p 22)	Profil chromatographique d'une solution d'HpD(Queen Elisabeth Hospital) : Hp (I), HVD1 (II), HVD 2 (III), Pp (IV) et DHE (V), (V.Azzi, 1992)
figure IV.6 (p 24)	Spectre d'absorption d'une solution d'HpD (5µg/ml) dans du tampon phosphate (PBS, pH 7,4)
figure IV.7 (p 25)	Spectre d'excitation de fluorescence d'une solution d'HpD (5µg/ml) dans du tampon phosphate (PBS, pH 7,4)
figure IV.8 (p 26)	Spectre d'émission de fluorescence d'une solution d'HpD (5µg/ml) dans du tampon phosphate (PBS, pH 7,4)
Figure VIII, 1 (p 61)	Courbe de survie des cellules NHIK 3025 exposées à la lumière après 18 heures d'incubation avec 0,4 ou 12,5 µg/ml de photofrin (Moan 1984,1986).
Figure VIII.2 (p 65)	Structure en "Sandwich" des dimères de porphyrines
Figure IX.1 (p 71)	Structure chimique du MTT et de son produit de transformation

- Figure IX.2 (p 74)** Protocole expérimental des essais de cytotoxicité au MTT sur cellules HT29, après association séquentielle de deux photoirradiations (415 et 630 nm) en présence d'HpD.
- Figure IX.3 (p 76)** Protocole d'évaluation par cytométrie en flux de la fluorescence intracellulaire de l'HpD après photoirradiation des cellules HT29 en lumière bleue.
- Figure IX.4 (p 78)** Protocole de photoirradiation des solutions d'HpD (5µg/ml, pH 7,4) dans du PBS supplémenté de 10% de SVF.
- Figure IX.5 (p 79)** Courbes dose-réponse de cellules HT-29, ayant incubé pendant 3 heures avec de l' HpD puis exposées à différentes fluences de lumière bleue.
- Figure IX.6 (p 80)** Concentrations d'HpD requises pour induire 50% d'inhibition de la croissance cellulaire (IC₅₀) à une fluence donnée en lumière bleue. Les données correspondent à la moyenne de 3 essais réalisés en 8 exemplaires (l'erreur standard sur la moyenne est dans tous les cas inférieure à 5%).
- Figure IX.7 (p 81)** Courbes de cytotoxicité en fonction de la concentration en HpD. Photoirradiation en lumière bleue (0,01 J.cm⁻²), en lumière rouge (20 J.cm⁻²) et en association séquentielle des deux lumières (Bleue+Rouge). Chaque point représente la moyenne de 3 essais réalisés en 8 exemplaires (l'erreur standard calculée sur la moyenne est inférieure à 5%).
- Figure IX.8 (p 84)** Courbes de cytotoxicité obtenues par traitement avec la lumière bleue (0,25 J.cm⁻²), la lumière rouge (20 J.cm⁻²) et l'association séquentielle des deux lumières (Bleue+Rouge) en présence d'HpD. Chaque point représente la moyenne de 3 essais réalisés en 8 exemplaires (l'erreur standard calculée sur la moyenne est dans tous les cas inférieure à 5%).
- Figure IX.9 (p 84)** Courbes de cytotoxicité obtenues par traitement avec la lumière bleue (0,5 J.cm⁻²), la lumière rouge (20 J.cm⁻²) et l'association séquentielle des deux lumières (Bleue+Rouge) en présence d'HpD. Chaque point représente la moyenne de

3 essais réalisés en 8 exemplaires (l'erreur standard calculée sur la moyenne est dans tous les cas inférieure à 5%).

- Figure IX.10 (p 86)** Variation de l'indice d'interaction I en fonction des fluences de photoirradiation en lumière bleue associée à une fluence de 20 J.cm⁻² en lumière rouge, en présence d'HpD.
- Figure IX.11 (p 87)** Variation de l'indice d'interaction I pour des fluences en lumière bleue comprises entre 0 et 0,03 J.cm⁻² associées à une fluence de 20 J.cm⁻² en lumière rouge, en présence d'HpD.
- Figure IX.12 (p 88)** Variation de l'indice d'interaction I pour des fluences en lumière bleue comprises entre 0,03 et 0,1 J.cm⁻² associées à une fluence de 20 J.cm⁻² en lumière rouge, en présence d'HpD.
- Figure IX.13 (p 89)** Variation de l'indice d'interaction I pour des fluences en lumière bleue comprises entre 0,10 et 0,35 J.cm⁻² associées à une fluence de 20 J.cm⁻² en lumière rouge, en présence d'HpD.
- Figure IX.14 (p 89)** Variation de l'indice d'interaction I pour des fluences en lumière bleue comprises entre 0,35 et 0,5 J.cm⁻² associées à une fluence de 20 J.cm⁻² en lumière rouge, en présence d'HpD.
- Figure IX.15 (p 91)** Evolution de la fluorescence de l'HpD intracellulaire sur cellules HT29 photoirradiées et analysées par CMF. Chaque point représente la moyenne obtenue sur au moins trois essais (l'erreur standard calculée sur la moyenne est inférieure 5%)
- Figure IX.16 (p 96)** Superposition d'un spectre d'émission de fluorescence témoin d'une solution d'HpD (5 µg/ml) diluée dans du PBS supplémenté de 10% de SVF (pH 7,4).(1) à un spectre d'émission d'une solution d'HpD identique mais photoirradiée à 0,5 J.cm⁻² (2).

- Figure IX.17 (p 97)** Evolution de l'intensité de fluorescence intégrale entre 600 et 700 nm mesurée par spectrofluorimétrie sur solutions d'HpD supplémentées de 10% de sérum de veau fœtal et exposées à différentes fluences en lumière bleue. Chaque point représente la moyenne d'au moins trois essais .
- Figure IX.18 (p 99)** Spectre différentiel typique de fluorescence, obtenu par soustraction du spectre d'émission d'une solution d'HpD (5 mg/ml dilué dans du PBS supplémenté de 10% de SVF) photoirradiée à $0,02\text{J.cm}^{-2}$ au spectre d'une solution témoin équimolaire sans photoirradiation.
- Figure IX.19 (p 100)** Spectre différentiel typique de fluorescence, obtenu par soustraction du spectre d'émission d'une solution d'HpD (5 mg/ml dilué dans du PBS supplémenté de 10% de SVF) photoirradiée à $0,5\text{J.cm}^{-2}$ au spectre d'une solution témoin équimolaire sans photoirradiation.
- Figure IX.20 (p 101)** Formation des photoproduits émettant à 651 nm en fonction des doses de lumière bleue. Chaque point représente la moyenne d'un minimum de trois essais .
- Figure IX.21 (p 102)** Spectre d'absorption différentielle d'une solution d'HpD ($5\text{ }\mu\text{g/ml}$ dans du PBS +10% sérum) exposée à la lumière bleue (0.1 mW.cm^{-2} , 0.5 J.cm^{-2}).
- Figure IX.22 (p 103)** Diminution de l'absorbance au niveau de la bande de Soret en fonction des fluences en lumière bleue. Chaque point représente la moyenne obtenue sur trois essais.
- Figure IX.23 (p 104)** Cinétique de formation des photoproduits en fonction des fluences d'exposition en lumière bleue, illustrée par l'absorbance relative de la solution irradiée à 642 nm comparée à celle de la même solution non irradiée ($\Delta A_{642}/A_{642}$). Chaque point représente la moyenne de trois essais.

- Figure X.1 (p 110)** Schéma du protocole expérimental de l'évaluation des cinétiques de photodégradation par le test biologique de cytotoxicité au MTT.
- Figure X.2 (p 113)** Variation de la fluorescence intracellulaire en fonction du pourcentage de sérum dans le milieu. Les valeurs représentées correspondent à la moyenne de trois essais et en raison de la faible importance des erreurs standards, elles sont dissimulées par les symboles du graphique.
- Figure X.3 (p 114)** Courbe de cytotoxicité des cellules HT29 en fonction de la concentration en HpD et en présence de taux différents de sérum dans le milieu d'incubation. Chaque point représente la moyenne de trois essais indépendants.
- Figure X.4 (p 117)** Spectres d'absorption d'une solution d'HpD (5µg/ml) dans du tampon phosphate (PBS, pH 7,4) sans sérum (1), avec 2% de SVF (2).
- Figure X.5 (p 118)** Spectres d'émission de fluorescence d'une solution d'HpD (5µg/ml) dans du tampon phosphate (PBS, pH 7,4) sans sérum (1), avec 2% de SVF (2).
- Figure X.6 (p 118)** Spectres d'excitation de fluorescence d'une solution d'HpD (5µg/ml) dans du tampon phosphate (PBS, pH 7,4) sans sérum (1, détecté à 615 nm) , avec 2% de SVF (2, détectée à 625 nm).
- Figure X.7 (p 120)** Courbe d'évolution de l'absorption à 395 nm pour des solutions d'HpD diluées dans du PBS (sans sérum) photoirradiées à différentes fluences.
- Figure X.8 (p 120)** Courbe d'évolution de l'absorption à 403 nm pour des solutions d'HpD diluées dans du PBS supplémenté de 2% de SVF, photoirradiées à différentes fluences.
- Figure X.9 (p 122)** Courbe de décroissance de l'intensité du pic de fluorescence à 615 nm sur les solutions d'HpD dans du PBS.

- Figure X.10 (p 122)** Courbe de décroissance de l'intensité du pic de fluorescence à 624 nm sur les solutions d'HpD dans du PBS supplémenté de 2% de SVF.
- Figure X.11 (p 125)** Courbes de décroissance du pouvoir de photoinactivation des cellules HT29 à une fluence de 0,5 J.cm⁻², en fonction des fluences de préirradiation des solutions d'HpD.
- Figure X.12 (p 126)** Courbe de cytotoxicité des cellules HT29 exposées à la lumière bleue ($\lambda < 415$ nm) à une fluence de 0,5 J.cm⁻² en fonction de la concentration en HpD (courbe de calibration).
- Figure X.13 (p 126)** Courbe de décroissance des concentrations actives d'HpD dans le milieu d'incubation après photoirradiation des solutions à différentes fluences en lumière bleue ($\lambda < 415$ nm).
- Figure X.14 (p 127)** Courbe semi logarithmique de la décroissance de la concentration active dans le milieu en fonction des fluences de préirradiation.
- Figure X.15 (p 129)** Images de fluorescence recueillies pendant 60 secondes. La cellule HT29 est photoirradiée par une lumière bleue ($\lambda < 480$ nm) à travers l'objectif du microscope. L'émission de fluorescence est recueillie à travers un filtre passe bande centré sur 630 nm.
- Figure X.16 (p 130)** Distribution topographique de l'intensité de fluorescence en niveaux de gris, dans les différents zones intracellulaires sur une cellule HT29 incubée à 50 µg/ml d'HpD pendant 18 heures.
- Figure X.17 (p 131)** Cinétique de photoblanchiment de l'HpD à partir d'images de fluorescence recueillies pendant 40 secondes sur une cellule HT29 isolée. L'intensité de fluorescence est exprimée en valeurs normalisées en rapportant l'intensité de fluorescence de chaque image (F) à l'intensité de fluorescence initiale (F₀) relevée au début de l'acquisition.

- Figure X.18 (p 132)** Représentation logarithmique de la cinétique de photoblanchiment de l'HpD sur la partie initiale de décroissance exponentielle (de 0 à 20 secondes).
- Figure X.19 (p 133)** Distribution topographique de l'intensité de fluorescence en niveaux de gris obtenues sur les images de fluorescence intracellulaire après exposition à la lumière.
- Figure X.19bis (p 134)** Distribution topographique de l'intensité de fluorescence en niveaux de gris obtenues sur les images de fluorescence intracellulaire après exposition à la lumière.
- Figure XI.1 (p 142)** Superposition des spectres d'émission de fluorescence de l'extrait tumoral après addition progressive d'incrément de 0,05 µg d'HpD et du spectre initial du même échantillon tumoral après extraction . Les points isobestiques se situent à 568 et 690 nm.
- Figure XI.2 (p 143)** Courbe d'évolution de l'intensité de fluorescence en fonction de la quantité d'HpD rajoutée.
- Figure XI.3 (p 144)** Spectres d'émission de fluorescence enregistrés sur tumeurs HT29 24 heures après injection par voie intrapéritonéale chez la souris d'une dose équivalente à 10 mg/kg Spectre A: enregistré sur tumeur témoin non-photoirradiée, spectre B: enregistré sur tumeur photoirradiée en lumière bleue (fluence: 1J.cm⁻²).
- Figure XI.4 (p 145)** Cinétique de décroissance de la fluorescence tumorale en fonction des fluences photoirradiation en lumière bleue. Les valeurs représentent la moyenne ($\pm$ écart type) des intensités de fluorescence obtenues sur cinq tumeurs différentes.
- Figure XI.5 (p 146)** Représentation semi-logarithmique de la décroissance exponentielle de la fluorescence intratumorale en fonction des fluences d'exposition en lumière bleue. Les valeurs représentent la moyenne ($\pm$ écart type) des intensités de fluorescence obtenues sur cinq tumeurs différentes

- Figure XI.6 (p 147)** Relation linéaire entre la quantité d'HpD extraite et la quantité injectée aux souris. La tumeur est prélevée 24 heures après injection de l'HpD. Chaque point de mesure représente la moyenne de quantités extraites sur cinq tumeurs différentes réalisées en triple exemplaire.
- Figure XI.7 (p 148)** Quantités d'HpD extraites sur différents échantillons tumoraux en fonction des doses d'exposition à la lumière bleue ($\lambda \leq 415$ nm). Chaque point correspond à la moyenne des quantités extraites sur cinq tumeurs différentes.
- Figure XI.8 (p 149)** Représentation semi-logarithmique de l'évolution des quantités d'HpD extraites sur les différents échantillons tumoraux en fonction de l'exposition à la lumière bleue. Chaque point correspond à la moyenne des quantités extraites sur cinq tumeurs différentes.
- Figure XI.9 (p 150)** Courbe de l'évolution des quantités d'HpD après exposition à différentes fluences en lumière rouge. Chaque point correspond à la moyenne des quantités extraites sur cinq tumeurs différentes.
- Figure XI.10 (p 151)** Représentation semi-logarithmique de la courbe d'évolution des quantités d'HpD après exposition à différentes fluences en lumière rouge. Chaque point correspond à la moyenne des quantités extraites sur cinq tumeurs différentes.
- Figure XII.1 (p 164)** Spectres d'émission de fluorescence sur tumeurs HT29 enregistrés 24h après injection aux souris d'une dose d'HpD de 10 mg/kg. Spectre A: avant photoirradiation, spectre B après photoirradiation en lumière bleue (1 J.cm^{-2})
- Figure XII.2 (p 165)** Spectres d'émission de fluorescence sur tumeurs HT29 enregistrés 24h après injection aux souris d'une dose d'HpD de 10 mg/kg. Spectre A: avant photoirradiation, spectre B après photoirradiation en lumière rouge (150 J.cm^{-2})
- Figure XII.3 (p 165)** Spectres d'émission de fluorescence sur tumeurs HT29 enregistrés 24h après injection de 10 mg/kg d'HpD Spectre A

avant photoirradiation, spectre B après association des deux lumières: bleue 1J.cm^{-2}) et rouge, 150 J.cm^{-2} .

- Figure XII.4 (p 167)** Quantités d'HpD extraites 24h après injection d'une dose d'HpD équivalente à 10 mg/kg , sur tumeurs témoins HT29 sans photoirradiation et sur tumeurs exposées à la lumière bleue (1J.cm^{-2}), à la lumière rouge (150 J.cm^{-2}) et à l'association des deux. Les résultats correspondent aux quantités moyennes obtenues sur cinq tumeurs ($\pm$ écart type).
- Figure XII.5 (p 168)** Quantités de MDA extraites sur des tumeurs HT29 non photoirradiées (sans HpD: témoin avec HpD: témoin HpD) et exposées à la lumière bleue (1 J.cm^{-2}), à la lumière rouge (150 J.cm^{-2}) et à l'association des deux. Les résultats correspondent aux quantité moyennes obtenue sur cinq tumeurs ($\pm$ écart type).
- Figure XII.6 (p 169)** Croissance tumorale sur cinq différents groupes de souris, deux groupes témoins non photoirradiés sans HpD et avec HpD et trois autres groupes correspondant aux souris traitées par exposition à la lumière bleue (1 J.cm^{-2}) à la lumière rouge (150 J.cm^{-2}) et à l'association séquentielle des deux lumières. Chaque groupe est constitué d'un nombre minimal de 6 souris.

LISTE DES TABLEAUX

- Tableau IX.1 (p 82)** Concentrations d'HpD requises pour produire le même effet (10, 50 et 90% d'inhibition de la croissance cellulaire) en lumière rouge (20 J.cm^{-2}) et en association la lumière rouge à des fluences ne provoquant pas de cytotoxicité en lumière bleue (0.01, 0,02, 0,03 et 0.05 J.cm^{-2}). Chaque valeur représente la moyenne de 3 essais réalisés en 8 exemplaires (l'erreur standard calculée sur la moyenne est inférieure à 5%).
- Tableau IX.2 (p 83)** Indices d'interaction obtenus pour trois iso-effets (10, 50 et 90%) par association de la lumière bleue à des fluences ne provoquant aucune cytotoxicité (0.01, 0,02, 0,03, et $0,05 \text{ J.cm}^{-2}$) à une fluence constante en lumière rouge (20 J.cm^{-2}).
- Tableau IX.3 (p 85)** Concentration d'HpD requises pour produire les iso-effets (10, 50 et 90%) en lumière rouge (20 J.cm^{-2}) et par association séquentielle de la lumière bleue (0.1, 0.25, 0,35 et 0.5 J.cm^{-2}) à la lumière rouge. Les valeurs représentées sont calculées à partir des courbes dose-réponse obtenues en présence d'HpD. Chaque point représente la moyenne de 3 essais réalisés en 8 exemplaires ($\text{SE} < 5\%$).
- Tableau IX.4 (p 85)** Indices d'interaction obtenus pour trois iso-effets (10, 50 et 90%) par association séquentielle de la lumière bleue à des fluences provoquant une effet cytotoxique (0.1, 0,25, 0,35 et $0,5 \text{ J.cm}^{-2}$) à une fluence constante en lumière rouge (20 J.cm^{-2}).
- Tableau IX.5 (p 94)** Constantes de photoblanchiment calculées sur les deux parties de la courbe de décroissance de fluorescence de

l'HpD sur cellules HT29 photoirradiées et analysées en CMF.

Tableau X.1 (p 121)	Constantes de photodégradation calculées à partir de la décroissance d'absorption au niveau de la bande de solet dans des solutions d'HpD avec sérum ($\lambda_{\text{solet}}=403$ nm) ou sans sérum ($\lambda_{\text{solet}}=395$ nm). Les valeurs calculées représentent la moyenne $\pm$ écart-type sur cinq essais.
Tableau X.2 (p 123)	Constantes de photodégradation calculées à partir de la décroissance de fluorescence des pics d'émission des solutions d'HpD à 624 nm en présence de sérum et à 615 nm en absence de sérum. Les valeurs calculées représentent la moyenne $\pm$ écart-type sur cinq essais.
Tableau X.3 (p 127)	Constantes de photodégradation de l'HpD évaluées à partir de la décroissance du pouvoir de photoinactivation des cellules.
Tableau X.4 (p 132)	Constantes d'extinction de la fluorescence intracellulaire calculées sur huit cellules HT29 isolées.
Tableau XI.1 (p 151)	Constantes de photodégradation calculées à partir des deux méthodes de mesure (spectrométrie et extraction chimique) pour les tumeurs photoirradiées en lumière bleue et en lumière rouge.
Tableau XI.2 (p 152)	Tableau récapitulatif des valeurs de constantes de photodégradation obtenues dans différents milieux: cellulaire, tumoral et aqueux. Les valeurs représentées pour les milieux cellulaires et aqueux correspondent à une constante calculée pour une concentration de 5 $\mu\text{g/ml}$. La constante de photodégradation évaluée par extraction chimique de l'HpD tumorale, correspond à la moyenne des valeurs obtenues sur les trois différents échantillons tumoraux .

Tableau XII.1 (p 166) Pourcentages de photoblanchiment déduits de la diminution de l'intensité du pic d'émission à 630 nm sur les spectres d'émission de fluorescence obtenus après photoirradiation des tumeurs en lumière bleue (1 J.cm^{-2}), en lumière rouge (150 J.cm^{-2}) et en associant les deux lumières. Les résultats représentent la moyenne obtenue sur un nombre minimal de quatre souris ($\pm$ écart type).

Tableau XII.2 (p 167) Comparaison des quantités d'HpD extraites des différents groupes de tumeurs (test Mann-Whitney), $n=5$; seuil de significativité $p=0,05$, NS: différence non significative.

COMMUNICATIONS

- 1 - **Zeghari N.**, Merlin J.L., Lignon D., Azzi S., Vigneron C., Guillemin F.;
« *Photobleaching de l'hématoporphyrine dérivée (HPD) et ses conséquences biologiques en thérapie photodynamique : étude in vitro sur cellules tumorales* »
11^e congrès annuel, Société française des lasers médicaux (SFLM),
Baqueira (Espagne) 29 janvier -1er février 1992
- PRIX JEUNE CHERCHEUR DE LA SOCIÉTÉ FRANÇAISE DES LASERS MÉDICAUX.**
- 2 - **Zeghari N.**, Merlin J.L., Lignon D., Marchal S., Vigneron C., Guillemin F.;
« *In Vitro Evaluation of Bleaching-Mediated Loss of Photodynamic Activity of Hematoporphyrin Derivative on Human Tumor Cells* »
International Conference "Photodynamic Therapy and Medical Laser Applications",
Milan (Italie), 25-27 juin 1992
- 3 - **Zeghari N.**, Merlin J.L., Lignon D., Marchal S., Vigneron C., Guillemin F.;
« *Influence of the Photobleaching of Hematoporphyrin Derivative on its Photodynamic Activity of Human Tumor Cells* »
EORTC-Preclinical Therapeutic Models Group Meeting, Nancy, 19 septembre 1992
- 4 - Merlin J.L., **Zeghari N.**, Griffon G., Ramacci C., Lignon D., Guillemin F.;
« *Influence of Light Fractionation on the Photodynamic Activity of Hematoporphyrin Derivative on Human Tumor Cell Lines* »
International Conference "Photodynamic Therapy and Medical Laser Applications",
Milan (Italie), 25-27 juin 1992
- 5 - Merlin J.L., Meunier-Reynes A., **Zeghari N.**, Ramacci C., Lignon D., Azzi V., Diebold S., Notter D., Labrude P., Granjon Y., Vigneron C., Yvroud E., Guillemin F.;
« *Thérapie photodynamique : études précliniques in vitro et in vivo sur cellules d'adénocarcinome de côlon humain (HT-29)* »
12^e Forum de cancérologie, Paris, 11-13 juin 1992
- 6 - **Zeghari N.**, Merlin J.L., Lignon D., Marchal S., Azzi V., Vigneron C., Guillemin F.;
« *Conséquences du photoblanchiment sur la cytotoxicité, la fluorescence et la composition chimique de l'hématoporphyrine dérivée en thérapie photodynamique* »
13^e Forum de cancérologie, Paris, 14-16 juin 1993
- 7 - **Zeghari N.**, Merlin J.L., Bolotine L., Marchal S., Vigneron C., Guillemin F.;
« *Détermination de l'effet de photoblanchiment et de la formation des photoproduits de l'hématoporphyrine dérivée sur la cytotoxicité des cellules tumorales* »
Colloque de la Société française de photobiologie, Paris, 5-7 décembre 1994
- 8 - Bezdetnaya L., **Zeghari N.**, Barberi-Heyob M., Merlin J.L., Potapenko A., Guillemin F.;
« *Quantum Yields of Photodegradation of Protoporphyrin IX in Solution : Luminescent, Spectrophotometric and Biological Testing of Photobleaching* »
EUROPTO, congrès de l'European Optical Society and SPIE, Lille, 5-9 septembre 1994
- 9 - Bolotine L., **Zeghari N.**, Merlin J.L., Potapenko A., Guillemin F.;
« *Influence du microenvironnement biologique sur le rendement quantique de photodégradation des porphyrines : approche expérimentale* »
Colloque de la Société française de photobiologie, Paris, 5-7 décembre 1994

- 10 - Rezzoug H., Meunier A., Merlin J.L., Lignon D., **Zeghari N.**, Yvroud E., Guillemin F.;
« Evaluation de la profondeur de pénétration de la lumière utilisée en thérapie photodynamique, in vivo dans des xénogreffes tumorales »
 14^e Forum de cancérologie, Paris 30 mai - 1er juin 1994
- 11 - Guillemin F., Granjon Y., Yvroud E., Merlin J.L., Bolotina-Bezdetnaya L., Lignon D., **Zeghari N.**, Rezzoug H., Barberi-Heyob M., Meunier-Reynes A., Abdunour C., Muller L., Jaffry F., Potapenko A., Notter D., Vigneron C.;
« Dosimétrie en thérapie photodynamique »
 Colloque de la Société française de photobiologie, Paris, 5-7 décembre 1994
- 12 - **Zeghari N.**, Merlin J.L., Bezdetnaya L., Marchal S., Barberi-Heyob M., Vigneron C., Guillemin F.;
« Exposure of Hematoporphyrin Derivative-Sensitized Cells to Light Simulating Fluorescence Detection Impairs the Cytotoxicity Induced by Subsequent 630 nm Light Exposure : Implication of Photobleaching Process and Photoproducts Formation »
 86th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Toronto (Canada), 18-22 mars 1995, Proceedings de l'American Association of Cancer Research, 36, 608, abst 3617, 1995
- 13 - Lignon D., A'Amar O., Khemis K., Guillemin F., Merlin J.L., **Zeghari N.**, Rezzoug H., Granjon Y., Yvroud E.;
« Détection précoce des tumeurs cancéreuses par imagerie et spectres de la fluorescence endogène »
 Colloque OPT'DIAG 95., Paris, 18 mai 1995
- 14 - Rezzoug H., Merlin J.L., Lignon D., Ramacci C., Marchal S., Bolotine L., **Zeghari N.**, Yvroud E., Guillemin F.;
« Évaluation in vitro de l'activité photodynamique de la méso-tétra (m-hydroxyphényl) chlorine (MTHPC) »
 15^e Forum de cancérologie, Paris, 12-14 juin 1995
 Bulletin du cancer, 82, 6, 457, 1995
- 15 - Guillemin F., Yvroud E., Merlin J.L., Bolotina-Bezdetnaya L., Lignon D., **Zeghari N.**, Rezzoug H., Barberi-Heyob M., Meunier-Reynes A., Granjon Y., Abdunour C., Müller L., Jaffry F., Notter D., Vigneron C.;
« Optical Instrumentation Suitable for Real-Time Dosimetry During Photodynamic Therapy »
 BIOS Europe '95, Barcelone (Espagne), 12-16 septembre 1995
- 16 - Guillemin F., Granjon Y., Yvroud E., Merlin J.L., Louis V., Lignon D., Bolotina-Bezdetnaya L., **Zeghari N.**, Rezzoug H., Barberi-Heyob M., Meunier-Reynes A., Abdunour C., Müller L., Jaffry F., Potapenko A., Notter D., Vigneron C.;
« Dosimétrie en thérapie photodynamique »
 14^e congrès de la Société française des lasers médicaux, Les Arcs, 20-24 mars 1995
- 17 - Jaffry F., A'Amar O., Guillemin F., Abdunour C., Müller L., Granjon Y., Yvroud E., Lignon D., Merlin J.L., Bolotina-Bezdetnaya L., **Zeghari N.**, Rezzoug H., Khemis K., Barberi-Heyob M., Meunier-Reynes A., Potapenko A., Notter D., Vigneron C.;
« Dosimétrie en thérapie photodynamique »
 Colloque OPT'DIAG 95, Paris, 18 mai 1995

PUBLICATIONS

- 1 - **Zeghari N.**, Merlin J.L., Lignon D., Marchal S., Vigneron C., Guillemin F.;
« In Vitro Evaluation of Bleaching-Mediated Loss of Photodynamic Activity of Hematoporphyrin Derivative on Human Tumor Cells »
Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers, Excerpta Medica, International Congress Series 1011. Spinelli P, Dal Fante M, Marchesini R, editors. Elsevier Sciences Publishers, Amsterdam, 508-512, 1992
- 2 - **Zeghari N.**, Merlin J.L., Lignon D., Marchal S., Vigneron C.;
« Influence of the Photobleaching of Hematoporphyrin Derivative on its Photodynamic Activity of Human Tumor Cells »
In Ditttrich C & Aapro M, Editors. "Drugs, Cells & Cancer, Report 1992", 37-41, DI Welley, Vienna, 1992
- 3 - **Zeghari N.**, Merlin J.L., Lignon D., Marchal S., Vigneron C., Guillemin F.;
« In Vitro Evaluation of Bleaching-Mediated Loss of Photodynamic Activity of Hematoporphyrin Derivative on Human Tumor Cells »
Laser in Medical Science, 7, 224, 1992
- 4 - Merlin J.L., **Zeghari N.**, Griffon G., Ramacci C., Lignon D., Guillemin F.;
« Influence of Light Fractionation on the Photodynamic Activity of Hematoporphyrin Derivative on Human Tumor Cell Lines »
Photodynamic Therapy and Biomedical Lasers, Excerpta Medica, International Congress Series 1011. Spinelli P, Dal Fante M, Marchesini R, Editors. Elsevier Sciences Publishers, Amsterdam, 503-507, 1992
- 5 - Merlin J.L., Meunier-Reynes A., **Zeghari N.**, Ramacci C., Lignon D., Azzi V., Diebold S., Notter D., Labrude P., Granjon Y., Vigneron C., Yvroud E., Guillemin F.;
« Thérapie photodynamique : études précliniques in vitro et in vivo sur cellules d'adénocarcinome de côlon humain (HT-29) »
Bulletin du cancer, 79, 615, 1992
- 6 - Merlin J.L., Azzi S., Lignon D., Ramacci C., **Zeghari N.**, Guillemin F.;
« MTT Assays Allow a Quick and Reliable Measurement of the Response of Human Tumour Cells to Photodynamic Therapy »
European Journal of Cancer, 28A, 8/9, 1452-1458, 1992
- 7 - Guillemin F., Meunier A., Granjon Y., Abdunour C., Muller L., **Zeghari N.**;
« Thérapie photodynamique, dosimétrie »
Proceedings du 11^e congrès annuel, Société française des lasers médicaux (SFLM), Baqueira (Espagne) 29 janvier -1er février 1992
- 8 - **Zeghari N.**, Merlin J.L., Lignon D., Marchal S., Azzi V., Vigneron C., Guillemin F.;
« Conséquences du photoblanchiment sur la cytotoxicité, la fluorescence et la composition chimique de l'hématoporphyrine dérivée en thérapie photodynamique »
Bulletin du cancer 80:6, 502, 1993
- 9 - **Zeghari N.**, Merlin J.L., Bolotine L., Marchal S., Vigneron C., Guillemin F.;
« Détermination de l'effet de photoblanchiment et de la formation des photoproduits de l'hématoporphyrine dérivée sur la cytotoxicité des cellules tumorales »
Proceedings du colloque de la Société française de photobiologie, Paris, 1994

- 10 - Zeghari N., Merlin J.L., Bolotine L., Marchal S., Vigneron C., Guillemin F.;
« **Exposure of HpD-Sensitized Cells to Light Simulating Fluorescence Detection Impairs the Cytotoxicity Induced by Subsequent 630 nm Light Exposure : Implication of Photobleaching Process and Photoproducts Formation** »
Soumise à l'European Journal of Cancer
- 11 - Bolotine L., Zeghari N., Merlin J.L., Potapenko A., Guillemin F.;
« **Influence du microenvironnement biologique sur le rendement quantique de photodégradation des porphyrines : approche expérimentale** »
Proceedings du colloque de la Société française de photobiologie, Paris, 1994
- 12 - Bezdetnaya L., Zeghari N., Barberi-Heyob M., Merlin J.L., Potapenko A., Guillemin F.;
« **Quantum Yields of Photodegradation of Protoporphyrin IX in Solution : Luminescent, Spectrophotometric and Biological Testing of Photobleaching** »
Proceedings EUROPTO, congrès de l'European Optical Society SPIE, 2325 pp 248-258
Lille, 5-9 septembre 1994
- 13 - Rezzoug H., Meunier A., Merlin J.L., Lignon D., Zeghari N., Yvroud E., Guillemin F.;
« **Evaluation de la profondeur de pénétration de la lumière utilisée en thérapie photodynamique, in vivo dans des xénogreffes tumorales** »
Bulletin du cancer, 81:6, 553, 1994
- 14 - Guillemin F., Granjon Y., Yvroud E., Merlin J.L., Bolotina-Bezdetnaya L., Lignon D., Zeghari N., Rezzoug H., Barberi-Heyob M., Meunier-Reynes A., Abdounour C., Muller L., Jaffry F., Potapenko A., Notter D., Vigneron C.;
« **Dosimétrie en thérapie photodynamique** »
Proceedings du colloque de la Société française de photobiologie, Paris, 1994
- 15 - Rezzoug H., Merlin J.L., Zeghari N., Lignon D., Marchal S., Ramacci C., Yvroud E., Guillemin F.;
« **Cellular Uptake Kinetics and Photodynamic Activity of Meso-Tetrahydroxyphenylchlorin (MTHPC)** »
SPIE 1995, sous presse
- 16 - Guillemin F., Yvroud E., Merlin J.L., Bolotina-Bezdetnaya L., Lignon D., Zeghari N., Rezzoug H., Barberi-Heyob M., Meunier-Reynes A., Granjon Y., Abdounour C., Müller L., Jaffry F., Notter D., Vigneron C.;
« **Optical Instrumentation Suitable for Real-Time Dosimetry During Photodynamic Therapy** »
SPIE 1995, sous presse

MTT Assays Allow Quick and Reliable Measurement of the Response of Human Tumour Cells to Photodynamic Therapy

Jean-Louis Merlin, Samir Azzi, Dominique Lignon, Carole Ramacci, Nadia Zeghari and François Guillemin

MCF-7 and HT-29 cell lines were selected as a reliable model to examine the possible parameters affecting the sensitivity of tumour cells to photodynamic therapy (PDT) using a dye-laser at 630 nm. The chemical composition of haematoporphyrin derivative (HPD) was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) analysis and was in agreement with reported values. MTT assays were performed to assess the time-dependency of PDT and the influence of the output power and light fluence. The results showed a maximal cytotoxicity 48 h after photoirradiation. The output power (1 or 2 W) did not significantly affect the cytotoxicity when the fluence was constant (20 J/cm²). However, an increase in fluence (10–40 J/cm²) led to a significant enhancement of cytotoxicity until maximal values were reached (30–40 J/cm²). A further increase in fluence (50 J/cm²) proved to induce a fall-off in cytotoxicity related to the intense photobleaching of HPD.

Eur J Cancer, Vol. 28A, No. 8/9, pp. 1452–1458, 1992.

INTRODUCTION

PHOTODYNAMIC THERAPY (PDT) is based upon the specific properties of a compound such as haematoporphyrin derivative (HPD) to be retained in tumour tissue longer than in normal tissues such as skin, lung, brain, muscle [1]. When the sensitised tissue is exposed to an argon-dye laser generated red light (630 nm), the sensitiser is activated photochemically, thus permitting a selective destruction of the tumour. The resulting cytotoxicity has been reported to be induced by the generation of oxygen singlets [2], damaging mainly plasma membranes [3], mitochondria [4], cytoplasmic or nuclear organelles and enzymes [5, 6], in addition to the surrounding vessels [7]. Although it is well stated that the transport of HPD involves binding to serum proteins, the nature of the actual mechanism responsible for the

selective tumoral biodistribution of HPD remains unclear [8] but has been demonstrated to be related to the pH-mediated generation of ionic species in tumoral sites. However, at the cellular level, it has been demonstrated that HPD accumulation involves passive diffusion facilitated by the low tumour pH [9].

Since PDT was first introduced for the treatment of malignant tumours, more than 4000 patients have undergone this therapy [10, 11]. HPD has dominated the biomedical studies since its discovery in 1961 [12] and is now the only photosensitiser permitted for use in clinical trials mainly for the treatment of tumours of the upper aerodigestive tract [13, 14], gastrointestinal [15] or disseminated intraperitoneal [16] neoplasms. New developments are being investigated for the treatment of brain tumours [17] and attempts to use topic administration of HPD [18] have been reported. The main advantage of HPD lies in the lack of severe toxicity, especially on nonirradiated areas, while its major drawback is its chemical composition, comprising a mixture of several porphyrin-derived compounds including oligomeric species [19]. For this reason and despite numerous studies, the relationship between the chemical composition and the photodynamic activity of HPD remains unclear, the activity

Correspondence to J.-L. Merlin.

J.-L. Merlin, D. Lignon, C. Ramacci, N. Zeghari and F. Guillemin are at the Unité de Recherche en Thérapie Photodynamique and Centre Alexis Vautrin and S. Azzi is at the Laboratoire de Chimie Hématologique, Centre Régional de Transfusion Sanguine, Avenue de Bourgogne, F-54511 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France.

Revised 12 Dec. 1991; accepted 29 Jan. 1992.

being attributed to various components including dihaematoporphyrin ethers, esters or oligomeric compounds [1, 20, 21].

Therefore, the relationship between dose and cytotoxic effect should be defined in well-stated conditions and comparisons between the different HPD solutions established with regard to their respective chemical compositions since any difference could drastically modify the biological activity [22].

This study was developed to establish a reliable experimental model using a procedure based on colorimetric measurements proving less time-consuming than conventional colony-forming assays. The MTT assay would allow an easy-to-manage and rapid evaluation of parameters influencing cell and tumour response to PDT. The respective influence of the laser light power used for photoirradiation (output power), its total fluence (total energy per surface unit) and time dependency of the cytotoxicity were investigated.

MATERIALS AND METHODS

Cell lines and culture conditions

MCF-7 and HT-29, human breast and colon adenocarcinoma cell lines, respectively, were studied. MCF-7 cell line was examined because of its ability to form three-dimensional models such as spheroids which is planned as a future extension of our experimental study. HT-29 cells were grown according to the recommendations of our research group (French INSERM network of scientists "Cancer Photochemotherapy"), since they could easily be xenografted into athymic mice and used as an *in vivo* model.

Both cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagles medium (Intermed, Noisy-le-Grand), supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS; Sigma), penicillin and streptomycin at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Serum-containing medium was preferred in order to mimic the *in vivo* biological conditions since HPD is known to be transported bound to serum proteins.

The cultures proved to be mycoplasma-free by the EORTC Clonogenic Assay Screening Study Group test procedure (Dr L. Suardet, Institut Suisse de Recherches Experimentales sur le Cancer, Lausanne).

Exponentially growing cells were harvested by enzymatic disaggregation (trypsin-EDTA) and assayed for cytotoxicity.

Haematoporphyrin derivative

HPD was purchased from the Queen Elizabeth Hospital, Woodville, Australia, in 5 mg/ml solution for human use and stored at 0°C in the absence of light. Aliquots were diluted in physiological saline to produce *in vitro* concentrations ranging from 1 to 200 µg/ml and were used within 24 h.

High-performance liquid chromatography (HPLC)

The HPD solution was characterised by HPLC analysis using a Vista LC 5500 system (Varian) on a C18 Novapak column (160 × 4.6 mm; Waters, St Quentin en Yvelines). Linear gradient elution was performed from a mixture made of 5 mmol/l tetrabutylammonium phosphate : acetonitrile : methanol (45:45:10 v/v/v) to acetonitrile : methanol (90:10 v/v) at a flow rate of 1 ml/min. The ultraviolet detection was carried out at 405 nm as reported [21].

HPD-uptake kinetics

Monolayered cell cultures plated in 25 cm² culture flasks (2 × 10⁶ cells per flask) were incubated in 5–100 µg/ml HPD solutions at 37°C. One flask was used for each concentration and each

time of incubation. The cells were incubated with HPD then harvested by trypsinisation, washed twice and resuspended in phosphate buffered saline (PBS) before being assayed for intracellular fluorescence in an Orthocyte flow cytometer (Ortho Diagnostics) using excitation at 488 nm. The fluorescence was detected above 600 nm as described elsewhere [23]. Cells were first identified and selected using forward angle light scattering (FALS) and then analysed for red fluorescence emitted by intracellular HPD. Logarithmic amplification was applied to the signals in order to obtain the whole range of HPD concentrations (5–100 µg/ml) on the same scale. Each analysis was performed on a minimum of 10⁴ cells. Red fluorescence histograms were analysed and the values of the median peak channel (*N*) were converted into relative fluorescence intensities (*F*) using the equation $F = 10^{N/100}$. Therefore, in the case of logarithmic amplification, a 2-fold increase in the fluorescence channel number represents a 10-fold increase in fluorescence.

Photoirradiation

Cells in 96-well dishes (2 × 10⁴ cells per well) were incubated with HPD for 3 h, then washed twice with PBS to remove non-internalised HPD, and resuspended in phenol red-free medium, since it was shown to interfere with PDT on MCF-7 cells [24]. The dishes were then immediately photoirradiated at 630 nm using a Spectra Physics 375B argon-pumped dye laser (Spectra Physics, Les Ulis). The standardisation experiments were first performed with a total fluence of 20 J/cm² and an output power of 1 W. The effect of both parameters on cytotoxicity was then evaluated using output powers of 1 and 2 W and fluences from 10 to 50 J/cm². Light spots of 22 cm in diameter were used for simultaneous irradiation of two microwell dishes. The spot homogeneity was adjusted by fastening the optical fibre and controlled photoelectrically. All dishes were kept covered during the photoirradiation in order to maintain the sterility of the culture. The temperature was controlled by immersion of a NiCr/NiAl thermal probe in the culture medium through the cover of the multiwell dishes exposed to light.

Cytotoxicity assays

MTT assays were carried out according to a procedure based on Tada *et al.* [25]. MTT, 3-[(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma) was dissolved in PBS, filter sterilised and stored at 4°C. After photoirradiation, the dishes were incubated at 37°C for 0–72 h. 50 µl of a 0.5% MTT solution was added to each well and incubated for 3 h at 37°C to allow MTT metabolism.

The crystals formed were dissolved within 15–30 min, by adding 100 µl per well of 25% SDS solution and vigorously pipetted to ensure homogeneity of solution prior to scanning. The absorbances at 540 nm were measured on a Multiskan MCC 340 plate reader (Flow). The results were compared with the control wells and expressed with respect to control values.

RESULTS

Chemical characterisation of HPD

The reversed phase HPLC analysis of HPD revealed a mixture of monomeric porphyrins: haematoporphyrin IX (Hp), 2-hydroxyethylvinyldeuteroporphyrin isomers (HVD1, HVD2), protoporphyrin (Pp) and a hydrophobic fraction containing dihaematoporphyrin ether ester (DHE) and oligomeric compounds. The retention times (Fig. 1) were found to be 3.3 min for Hp, 7.1 min for HVD1, 8.0 min for HVD2 and 10.0 min for Pp. DHE and oligomeric compounds eluted between 10 and

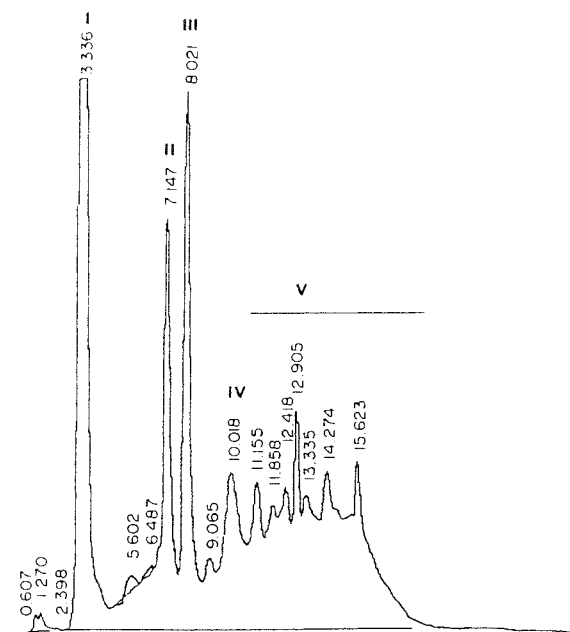


Fig. 1. Reversed phase HPLC analysis of HPD. Analysis was performed on a C18 Novapak column (160×4.6 mm) using linear gradient elution at 1 ml/min and detection at 405 nm. Retention times were 3.3 min for Hp (I), 7.1 min for HVD1 (II), 8.0 min for HVD2 (III), 10.0 min for Pp (IV), DHE (V) was eluted between 10 and 20 min.

20 min. The respective amounts of each compounds were calculated: 31% for Hp, 8.7% for HVD1, 10.4% for HVD2, 7.7% for Pp and 38.6% for DHE and oligomeric compounds.

HPD-uptake kinetics

The uptake kinetics of HPD were determined using MCF-7 and HT-29 cells incubated in 5, 10, 20, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ HPD solutions for 1, 3, 24 and 48 h.

The results (Fig. 2) expressed as relative fluorescence intensity showed that the concentration of intracellular HPD rose with

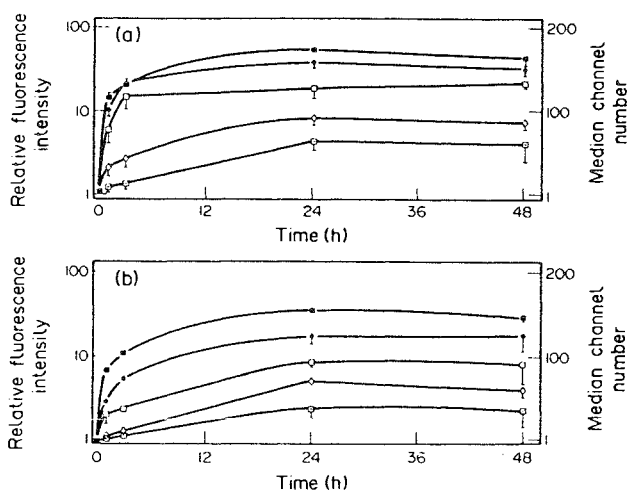


Fig. 2. HPD uptake kinetics. Cells were incubated in 5–100 $\mu\text{g/ml}$ HPD solutions then trypsinised and analysed by flow cytometry with excitation at 488 nm and detection above 600 nm. Results are mean relative fluorescence intensities deduced from median peak values of duplicated red-fluorescence histograms (S.D.). $\square$ 5 $\mu\text{g/ml}$, $\diamond$ 10 $\mu\text{g/ml}$, $\square$ 20 $\mu\text{g/ml}$, $\blacklozenge$ 50 $\mu\text{g/ml}$, $\blacksquare$ 100 $\mu\text{g/ml}$, (a) MCF-7, (b) HT-29 cells.

extracellular concentration and time of incubation. Maximal values were attained at about 24 h with no further significant increase in HPD accumulation up to 48 h.

A 3-h incubation was selected for all the following experiments in order to shorten the total duration of the assay since similar results were obtained using 24- and 48-h time points.

HPD-uptake kinetics were established on both cell lines and showed the same general pattern although MCF-7 cells (Fig. 2a) appeared to incorporate approximately twice as much HPD as HT-29 cells (Fig. 2b).

Thermal effect of PDT

The exposure to a 20 J/cm^2 light did not generate any noticeable temperature fluctuations. As the photoirradiation was performed in a 25°C heated room, a slight decrease in temperature tended to stabilise the medium temperature near 25°C in 60 min. This slight drop in temperature did not affect the growth of HT-29 or MCF-7 cells in unirradiated control dishes (data not shown). No thermal effect appeared thereafter to be associated with PDT under our experimental conditions using 630 nm light, large spot irradiation and the cytotoxic effects assessed in the following experiments resulted only from the photodynamic activity.

Cytotoxicity assays

Before performing cytotoxicity assays, we examined the linearity of the MTT assay with increasing number of cells plated between 10^4 and 10^6 cells/ml and found quite satisfactory results for both cell lines ($r > 0.995$). Blank measurements were performed on wells containing no cell and no HPD. Other possibilities, no cell with various HPD concentrations (100 or 200 $\mu\text{g/ml}$) were examined and were found not to induce any significant differences.

The HPD solution did not appear cytotoxic in either MCF-7 or HT-29 cells lines when the cells were not exposed to light. Similarly, light exposure alone (20 J/cm^2) did not induce any significant cytotoxicity in either cell line (data not shown).

MTT assays, performed 0, 24, 48, 72 h after the PDT (20 J/cm^2) (Fig. 3) on cells plated into multiwell dishes, indicated that the effects of PDT were time-dependent. Maximal cell killing was not apparent immediately after the exposure to light and appeared to increase with time up to a maximal value 48 h after photoirradiation. A longer interval of time (72 h) brought on an apparent regrowth since the surviving cells probably began to divide.

The two cell lines showed a similar pattern of time-delayed cytotoxicity. According to the HPD uptake results obtained by flow cytometry analyses, HT-29 cells (Fig. 3b) appeared to be slightly more sensitive to PDT than MCF-7 cells (Fig. 3a) since no significant difference could be found between these two cell lines in terms of cytotoxicity to HPD, while HT-29 cells internalised less HPD than MCF-7 cells. All the following experiments were carried out by MTT assays performed 48 h after PDT.

Influence of the output power

MTT assays were performed on cells receiving the same total fluence of 20 J/cm^2 but at different rates: 1 W during 134 min and 2 W during 67 min; no significant differences were detected between the two series of experiments (Fig. 4).

Light exposure alone (thermal effect) did not appear to affect the growth rate of cells receiving only photoirradiation as these were comparable to the growth rates of control cells (data not

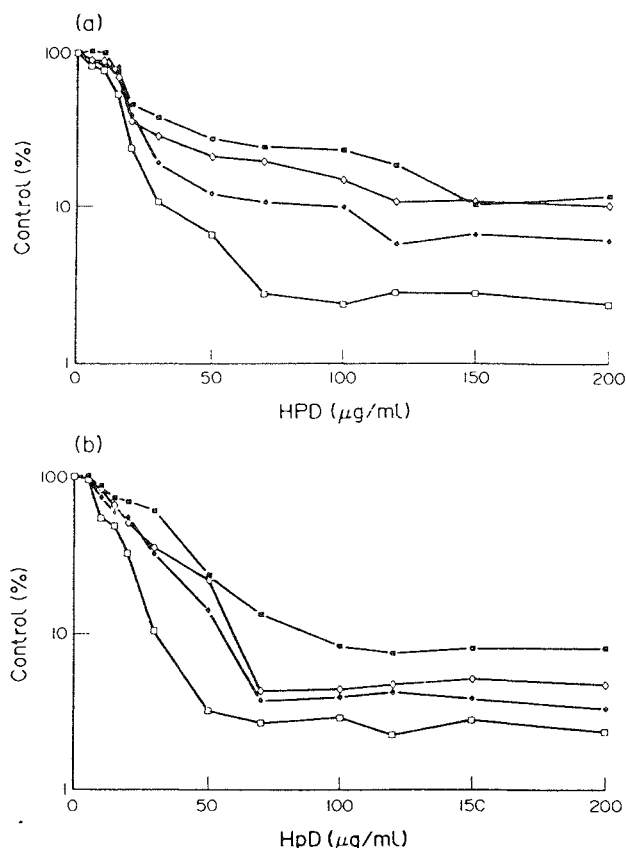


Fig. 3. Time delayed cytotoxicity of PDT. MTT assays were performed immediately ($\blacksquare$), or 24 ($\blacklozenge$), 48 ($\square$) or 72 h ($\diamond$) after exposure of the cells to 630 nm light. Results are mean values of three triplicated assays. S.D. were always less than 10% of the values. (a) MCF-7, (b) HT-29 cells.

shown). These results were consistent for both MCF-7 (Fig. 4a) and HT-29 (Fig. 4b) cell lines. A 2 W photoirradiation was selected for the following experiments in order to shorten the duration of light exposure.

Influence of the total fluence

Variation of the total light fluence from 10 to 50 J/cm² was achieved by increasing the overall duration of exposure of a 2 W light spot from 34 to 168 min. Increasing the total fluence (Fig. 5) caused a proportional enhancement of the cytotoxicity from 10 to 40 J/cm². A 50 J/cm² light fluence did not appear to induce any further increase in cytotoxicity. At the highest HPD concentrations, a fall-off in cytotoxicity was noted for both cell lines and seemed to be correlated to the fluence value. Plotting the results as % control vs. fluence for HPD concentration of 20, 50, 100, 150 and 200 μ g/ml (Fig. 6) clearly demonstrated that an increase in both fluence and HPD extracellular concentration resulted in a decrease in cytotoxicity. Between 30 and 40 J/cm², the pattern of cytotoxicity was thoroughly modified; at 50 J/cm², the results appeared conflicting since the highest HPD concentrations produced the lowest cytotoxicity.

From these results, the rate of the loss of photodynamic activity induced by photo-irradiation at high fluences was estimated. For 50, 100, 150 and 200 μ g/ml HPD concentrations, iso-effects lower concentrations leading to the same cytotoxicity were deduced from the dose-response curves of each cell line at 10, 20, 30, 40, and 50 J/cm² (Table 1). From these values, we

calculated the apparent rates of loss of photodynamic activity, i.e. the percentage of HPD unable to generate any photodynamic effect when exposed to light. These values were plotted against the fluence values for each HPD concentration (Fig. 7). This phenomenon appeared to be quite proportional to both the fluence and the HPD concentration and to reach high values (60–90%) for cells exposed to 50 J/cm².

DISCUSSION

The importance of an *in vitro* biological model for PDT using cultured cells is summarised in the following two points. Firstly, analysis and interpretation may be used for the development of mechanistic models. Secondly, they can be a simple way of evaluating photosensitisers from different origins and testing new photosensitisers. Many studies have already reported the survival rates of tumour cells to photosensitisers on models related to PDT using conventional clonogenic assays as a means of determining the overall survival rates of cells exposed to cytotoxic agents. However, these experiments are quite often time consuming since 7–21 days are needed to allow for colony formation [11, 26–28]. To our knowledge, other methods such as MTT assays to determine time-dependent cytotoxicity were not employed, although they could shorten the total duration of the experiment and yield more numerous results since most of the steps are automated. The results presented in this paper demonstrate that photodynamic survival curves obtained with MCF-7 or HT-29 cell lines and HPD using MTT assays are

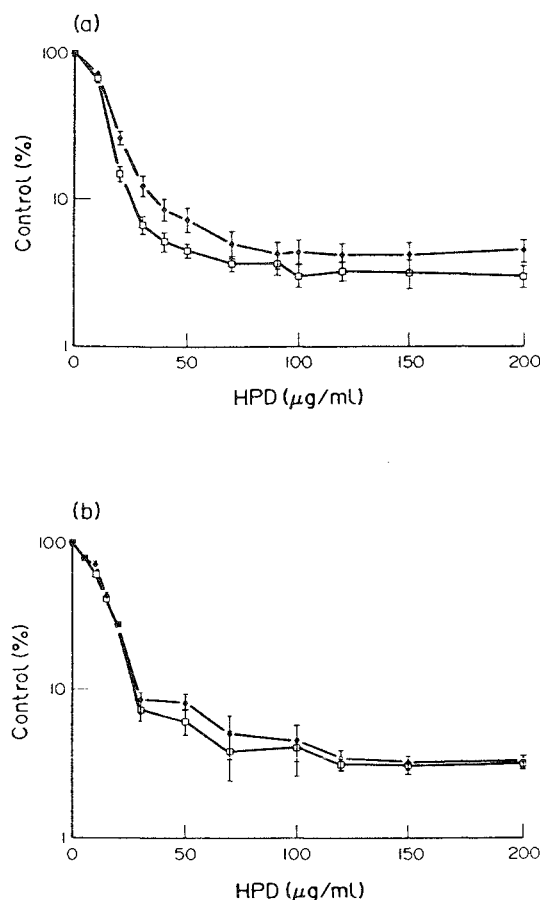


Fig. 4. Influence of the output power. Cells were exposed to a 20 J/cm² constant light fluence delivered by means of 1 ($\square$) or 2 ($\blacklozenge$) W laser light. Results are mean values of three triplicated assays (S.D.). (a) MCF-7, (b) HT-29 cells.

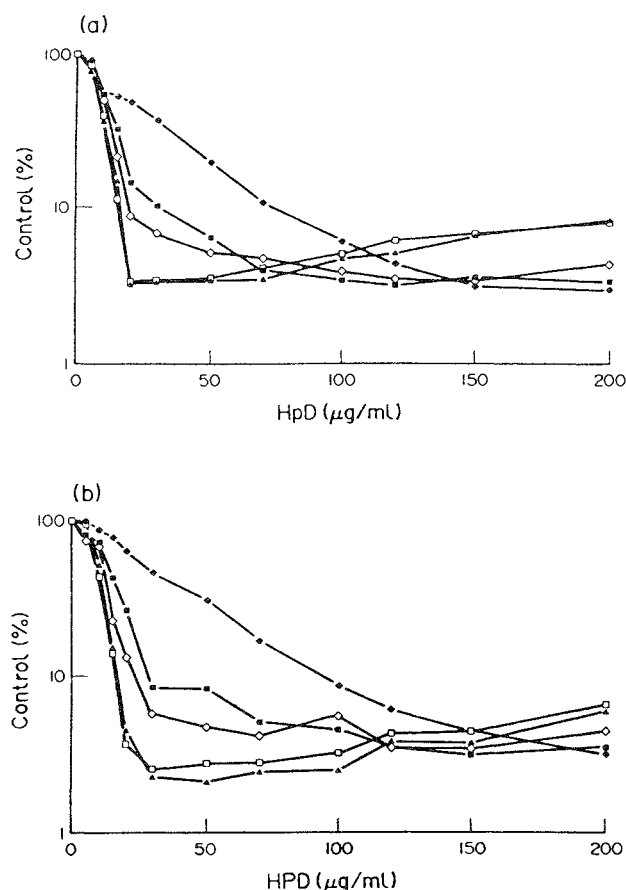


Fig. 5. Influence of the total light fluence. Using 2 W light, cells were exposed to fluences from 10 to 50 J/cm². Results are mean values of three triplicated assays. S.D. always less than 15% of the values were omitted from the graph. ◆ 10 J/cm², ■ 20 J/cm², ◇ 30 J/cm², ▲ 40 J/cm², □ 50 J/cm². (a) MCF-7, (b) HT-29 cells.

quite reproducible and yield results within 48 h. The general patterns of cytotoxicity obtained using MTT assays were consistent with those determined using conventional colony-forming assays on both MCF-7 (24) and HT-29 cells (data not shown). Although the variations of the IC₅₀ and IC₉₀ values were found between the two procedures, the values obtained with the MTT being approximately 1.5-fold higher, the difference remained in the range of the ratios previously reported [29] with anticancer agents.

Before concluding or comparing our results with previously published data, two important points have to be discussed concerning the chemical composition of the HPD solution employed and the level of interference due to thermal effects in our experimental system, since laser-generated light could increase the temperature of the culture media and potentiate the effects of PDT as already reported [30–32].

The composition of our HPD solution was found to correlate with the values reported by Kessel [1, 21]: Hp 31%, HVD 19%, Pp 8% and DHE 39% for our solution against 35, 20, 5 and 35% reported by Kessel. Under our experimental conditions using large spot for photoirradiation no significant increase in temperature was noted, suggesting that the observed cytotoxic effects were due to PDT.

The results reported in this paper show that the cellular cytotoxicity of PDT is mainly due to time-delayed effects appearing maximal 48 h after photoirradiation, further support-

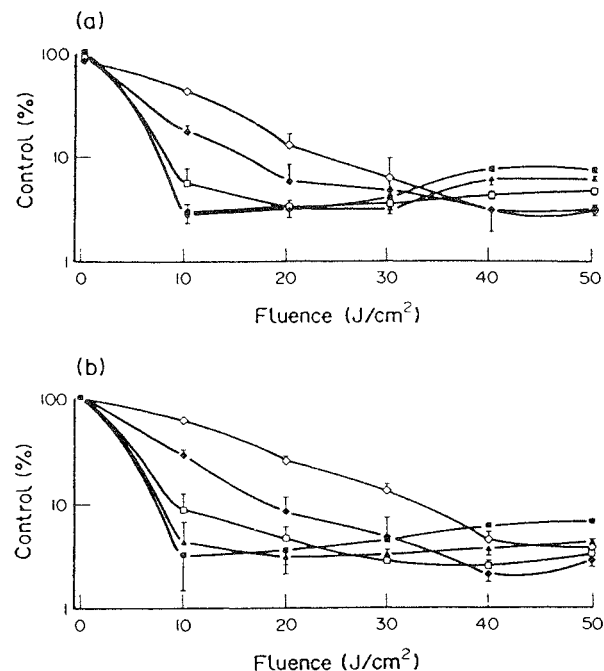


Fig. 6. Spontaneous decrease of the cytotoxicity. Decreases in cytotoxicity were observed in relation with the fluence value. This effect was particularly intense for cells exposed to high HPD concentrations and to high fluences (40 and 50 J/cm²). Results are mean values of three triplicated assays. S.D. always less than 15% of the values were omitted from the graph. ◇ 20 μg/ml, ◆ 50 μg/ml, □ 100 μg/ml, ▲ 150 μg/ml, ■ 200 μg/ml. (a) MCF-7, (b) HT-29 cells.

ing the comparison between X-ray irradiation cytotoxic effects and PDT [23]. The antitumour effects of PDT were found to be closely related to the total fluence up to 40 J/cm² where maximal values were attained. This effect may be linked to the occurrence of photobleaching that was clearly demonstrated by fluorescence studies, reporting high fluorescence decays comparable to the relative decrease in cytotoxicity we calculated from iso-effects HPD concentrations. Using 630 nm light, values of 50% photobleaching were reported to occur at 10 J/cm² [33] and 63% at 28 J/cm² [34] as well as 80% at 2.3 J/cm² using 404

Table 1. For each fluence value, the lowest HPD concentration leading to the same cytotoxicity (isoeffect concentration) as 50, 100, 150 and 200 μg/ml were deduced from the dose-response curve of each cell line

HPD (μg/ml)		Fluence (J/cm ²)				
		10	20	30	40	50
MCF-7 cells	50	—	—	—	—	20(60)
	100	—	—	—	30(60)	20(80)
	150	—	—	100(35)	30(80)	20(85)
	200	—	100(50)	70(65)	20(90)	20(90)
HT-29 cells	50	—	—	—	—	20(60)
	100	—	—	—	30(70)	20(80)
	150	—	—	70(55)	30(80)	20(85)
	200	—	120(40)	50(75)	30(85)	30(85)

Numbers in brackets express the relative quantity (%) of HPD, which appears to lose its photodynamic activity when exposed to high fluences.

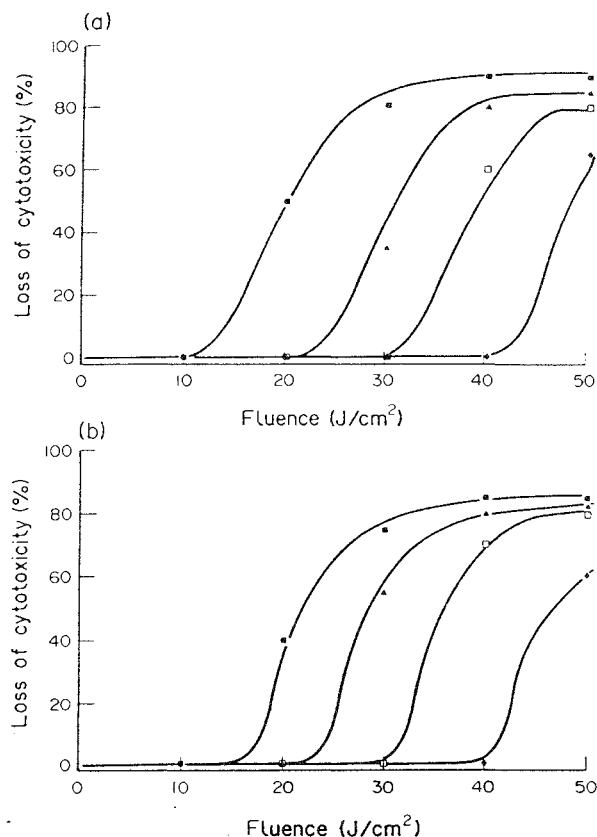


Fig. 7. Evaluation of the relative loss of cytotoxicity. Each point was calculated as ratios of isoeffect HPD low and high concentrations obtained with each fluence: 50 (◆), 100 (□), 150 (▲) and 200 (■) µg/ml. (a) MCF-7, (b) HT-29 cells.

nm light [35] on human tumour cells. This particular finding may prove very useful in clinical applications since overdosing light above this limit will only generate time consumption and raise the incidence of side-effects without enhancing the response. On the other hand, underdosing light could drastically affect the efficiency of PDT treatments since the antitumour effect could be lessened if no bleaching is generated (under the limit) but increased if the total fluence is set above the limit of photobleaching. This is of main importance in view of the major research interests in PDT arising from the fractionation of photoradiation [36], which should not be undertaken without taking into account this time dependency and the photobleaching phenomenon.

Throughout this study, MCF-7 and HT-29 cell lines appeared quite suitable to develop an experimental two-dimensional model for PDT.

The results reported in this paper emphasise the importance of both photosensitizer and light dosimetries in PDT. The pharmacological parameters of HPD, together with the optical characteristics of tissues are to be precisely determined in order to optimise both doses of HPD and light. In this particular case, and as far as dosimetry experiments are concerned, the development of three-dimensional models (*in vitro* or *in vivo*) is required to allow the extrapolation of the results to human clinical applications [37]. Such models for light dosimetry in human tumours are under current investigation.

1. Kessel D, Cheng ML. Biologic and biophysical properties of the tumor-localizing component of hematoporphyrin derivative. *Cancer Res* 1985, 45, 3053–3058.

2. Weishaupt KR, Gomer CJ, Dougherty TJ. Identification of singlet oxygen as the cytotoxic agent in photodestruction of a murine tumor. *Cancer Res* 1976, 36, 2326–2349.
3. Kessel D. Transport and binding of hematoporphyrin derivative and related porphyrins by murine leukemia L1210 cells. *Cancer Res* 1981, 41, 1318–1323.
4. Coppola A, Viggiani E, Salzarulo L, Rasile G. Ultrastructural changes in lymphoma cells treated with hematoporphyrin and light. *Am J Pathol* 1980, 99, 175–180.
5. Kessel D. Sites of photosensitization by derivatives of hematoporphyrin. *Photochem Photobiol* 1986, 44, 489–494.
6. Yanhua D, Xiaolin O, Zhongkang L, Hong L. Scanning electron microscopic observations on photodynamic effects on cells *in vitro*. *Lasers Med Sci* 1990, 5, 375–379.
7. Star WM, Marijnissen HPA, van der Berg-Blok AE, Versteeg JAC, Franken KAP, Reinhold HS. Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed *in vivo* in sandwich observation chambers. *Cancer Res* 1986, 46, 2532–2540.
8. Pottier R, Kennedy JC. The possible role of ionic species in selective biodistribution of photochemotherapeutic agents toward neoplastic tissue. *J Photochem Photobiol* 1990, 8, 1–16.
9. Evensen J, Moan J, Hindar A, Somer S. Tissue distribution of ³H-hematoporphyrin derivative and its main components, 67Ga and 131I-albumin in mice bearing Lewis lung carcinoma. In: Doiron DR, Gomer CJ, eds. *Porphyrin Localization and Treatment of Tumors*. New York, Alan R Liss, 1984, 541–562.
10. Carruth JAS. Photodynamic therapy: the state of the art. *Lasers Surg Med* 1986, 6, 404–407.
11. Dougherty TJ. Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors. *CRC Crit Rev* 1984, 2, 83–116.
12. Lipson RL, Blades EJ, Olsen AM. The use of a derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J Natl Cancer Inst* 1961, 26, 1–8.
13. Calzanara F, Tomio L, Norberto L, et al. Photodynamic therapy in the treatment of malignant tumours of the upper aerodigestive tract. *Lasers Med Sci* 1989, 4, 279–284.
14. Meunier A, Guillemin F, Kosminski P. The use of photodynamic therapy in the treatment of tumors of the upper aerodigestive tract. *Lasers Med Sci* 1991, 6, 121.
15. Patrice T, Foulletier MT, Yactayo S, et al. Endoscopic photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative for primary treatment of gastrointestinal neoplasms in inoperable patients. *Digest Dis Sci* 1990, 35, 545–552.
16. Sindelar WF, DeLaney TF, Tochner Z, et al. Technique for photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal malignant neoplasms. *Arch Surg* 1991, 126, 318–324.
17. Hill JS, Kaye AH, Sawyer WH, Morstyn G, Megison PD, Styli SS. Selective uptake of hematoporphyrin derivative into human cerebral gliomas. *Neurosurgery* 1990, 26, 248–254.
18. Ferrando R, Notter D, Stoeckel L, Azzi S, Labrude P, Vigneron C. Is skin permeable to hematoporphyrin derivative? *Lasers Med Sci* 1991, 6, 123.
19. Kessel D, Thompson P, Musselman B, Chang CK. Chemistry of hematoporphyrin-derived photosensitizers. *Photochem Photobiol* 1987, 46, 563–568.
20. Dougherty TJ. Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin II. *Photochem Photobiol* 1987, 46, 569–573.
21. Kessel D, Cheng ML. On the preparation and properties of dihematoporphyrin ether, the tumor-localizing component of HPD. *Photochem Photobiol* 1985, 41, 277–282.
22. Azzi S, Notter D, Merlin JL, Labrude P, Vigneron C. Attempts to improve the preparation and efficiency of a hematoporphyrin derivative solution. *Lasers Med Sci* 1991, 6, 123–124.
23. West CML, Moore JV. Flow cytometric analysis of intracellular hematoporphyrin derivative in human tumor cells and multicellular spheroids. *Photochem Photobiol* 1989, 50, 665–670.
24. Merlin J-L, Azzi S, Guillemin F, Marchal C, Weber B. Photodynamic therapy: *in vitro* model with MCF-7 breast adenocarcinoma cells. *Lasers Med Sci* 1991, 6, 120–121.
25. Tada H, Shito O, Kuroshima K, Koyama M, Tsukamoto K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Meth* 1986, 93, 157–165.
26. Perry RR, Matthews W, Mitchell JB, Russo A, Evans S, Pass HI. Sensitivity of different human lung cancer histologies to photodynamic therapy. *Cancer Res* 1990, 50, 4272–4276.
27. Gomer CJ, Rucker N, Murphee AL. Differential cell photosensitiv-

- ity following photodynamic therapy. *Cancer Res* 1988, 48, 4539-4542.
28. West CML, Moore JV. The photodynamic effects of Photofrin II, hematoporphyrin derivative, hematoporphyrin, and tetrasodium-meso-tetra (4-sulfonatophenyl)porphine *in vitro*: clonogenic cell survival and drug uptake studies. *Photochem Photobiol* 1989, 49, 169-174.
 29. Hill BT, Hosking LK, Whelan RDH. Comparative evaluation of the MTT and clonogenic cell survival assays for *in vitro* drug sensitivity testing and for establishing patterns of cross resistance in drug-resistant tumour cell lines. In: Ditttrich C, Aapro MS, eds. *Drugs, Cells and Cancer*. Vienna, DI Welley, 1988, 14-15.
 30. Christensen T, Whal A, Smedshammer L. Effects of hematoporphyrin derivative and light on combination with hyperthermia on cells in culture. *Br J Cancer* 1984, 50, 85-89.
 31. Svaasand LO. Photodynamic and photohyperthermic response of malignant tumors. *Med Phys* 1985, 12, 455-461.
 32. Gottfried V, Kimel S. Temperature effects on photo sensitized processes. *J Photochem Photobiol* 1991, 8, 419-430.
 33. Moan J, Christensen T, Jacobsen PB. Porphyrin-sensitized photoinactivation of cells *in vitro*. In: Doiron DR, Gomer CJ, eds. *Porphyrin Localization and Treatment of Tumors*. New York, Alan R Liss, 1984, 419-442.
 34. Grossweiner LI. Optical dosimetry in photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 1986, 6, 462-466.
 35. Mang TS, Dougherty TJ, Potter WR, Boyle DG, Somer S, Moan J. Photobleaching of porphyrins used in photodynamic therapy and implications for therapy. *Photochem Photobiol* 1987, 45, 501-506.
 36. Benstead K, Moore JV. The effect of fractionation of light treatment on necrosis and vascular function of normal skin following photodynamic therapy. *Br J Cancer* 1988, 58, 301-305.
 37. Hoffman RM. Three-dimensional histoculture: Origins and applications in cancer research. *Cancer Cells*, 1991, 3, 86-92.

Acknowledgements—The authors are grateful to Mrs F. Pauly and Mrs D Chanel for their expert technical and secretarial assistance and to Dr S. Shellard (ICRF in London) for kindly editing this paper. This study was supported by grants from the French "Ligue Nationale contre le Cancer" and performed within the French INSERM Network of Scientists "Cancer Photochemotherapy". Experimental data were partly presented at the Clonogenic Assay Screening Study Group meeting during the 1991 EORTC Joint Meeting in Vienna.

INFLUENCE OF LIGHT FRACTIONATION ON THE PHOTODYNAMIC ACTIVITY OF HEMATOPORPHYRIN DERIVATIVE ON HUMAN TUMOR CELL LINES.

J.L. Merlin, N. Zeghari, G. Griffon, C. Ramacci, D. Lignon and F. Guillemin

Unité de Recherche en Thérapie Photodynamique, URA CNRS 821,
Centre Alexis Vautrin, F-54511 Vandœuvre-les-Nancy Cedex, France

INTRODUCTION

Hematoporphyrin derivative-mediated photodynamic therapy (HPD-PDT) has been developed in biomedical studies and is now the only photosensitizer allowed for use in clinical trials for the treatment of tumours of the aero-digestive tract [1], gastrointestinal [2] or disseminated intraperitoneal [3] neoplasms. The selection of HPD was initially based upon the specific properties of this substance to be selectively retained in higher rates in tumour tissues [4]. Exposure of the sensitized tissues to light has been reported to selectively destroy the tumour by damaging plasma membranes, mitochondrias [5], cytoplasmic or nuclear organelles and enzymes [6] as well as the surrounding vasculature [7]. The main advantages of HPD lie in the lack of severe side-effects, while its major drawback remains its complex chemical composition which consists in a mixture of several porphyrin-derivated compounds including oligomeric species [8]. Actually and despite numerous studies, the structure-activity relationship remains under debate, the activity being ascribed to dihematoporphyrin ethers, esters or oligomeric compounds [3]. On another hand, it has been demonstrated that the cytotoxic activity of HPD depends on the light fluence but is drastically altered by the occurrence of photobleaching of the photosensitizer [9]. This study was proposed to investigate whether the fractionation of the light exposure could reduce the biological consequences of this phenomenon and further enhance the photodynamic potential activity of HPD.

MATERIAL AND METHODS

The whole experimental procedure is reported in a previously published paper [9]. Briefly, MCF-7 and HT-29, respectively human breast and colon adenocarcinoma cells were collected in DMEM (Seromed) supplemented with 10% fetal calf serum (Sigma) and assayed for cytotoxicity in 96-well dishes ($2 \cdot 10^4$ cells/well). The cells were incubated with HPD (Queen Elizabeth Hospital, Woodville, Australia) for 3 h, then resuspended in culture medium and exposed to 630 nm light using an argon-pumped dye laser (Spectra Physics). Total fluences of 20, or 60 J/cm² were administered in single, two or three fractions separated by 24 or 48 hrs. Cytotoxicity was assayed in adding 50 µl of 125 µmol/l MTT solution (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Sigma) in each well for 3 h at 37°C. Absorbance was measured at 540 nm on a Multiskan plate reader (Flow Laboratories) after 100 µl of sodium dodecyl sulfate solution (1 mol/l) was added in each well.

The results were expressed as % of control wells receiving neither HPD nor light

and kept incubated for 48h. Kinetics of HPD were established by flow cytometry (Orthocyte cytofluorometer, Ortho Diagnostic Systems). Excitation wavelength was set at 488 nm and emission was recorded above 580 nm. All the results are mean values of triplicated experiments.

RESULTS

Kinetics of Intracellular HPD

Flow cytometry analyses of the variations of intracellular HPD was performed on MCF-7 cells incubated in 20, 50 and 100 $\mu\text{g/ml}$ HPD solutions for 3 h then left protected from light, in HPD-free medium for 24 or 48 h, corresponding to the lapse of time including the successive fractions of photoirradiation. Results (table1) showed that intracellular HPD concentrations sharply decreased (-30 to 52%) within the first 24 h for all HPD concentrations. The relative rate of decrease was then quite reduced within the following 24h (-5 to 15%). The 48 h-values did not significantly differ from the 24 h-values (Student's t test, $p \leq 0.05$).

	HPD concentration ($\mu\text{g/ml}$)		
	20	50	100
3h incub.	10.5	59.3	100
+ 24h	5.0	38.8	69.8
+ 48h	4.5	36.3	56.5

Table 1:
Kinetics of intracellular HPD determined by flow cytometry. Data are mean fluorescence values relative to the concentration reached after 3h incubation at 37°C in 100 $\mu\text{g/ml}$ HPD solution. Cells were washed and left protected from light for 24 and 48 h at 37°C. (S.D were less than 15%)

Photodynamic activity of fractionated HPD-PDT

When 20 J/cm^2 total fluence was applied, fractionation decreased significantly the photodynamic activity of HPD on both cell lines (figure 1). On both cell lines, an increase in the cell number was observed for low HPD concentrations ($\leq 20 \mu\text{g/ml}$) exposed to fractionated light. This phenomenon was found more pronounced in HT-29 than in MCF-7 cells.

When 60 J/cm^2 total fluence (figure 2) was applied on cells incubated in low HPD concentrations ($\leq 20 \mu\text{g/ml}$), fractionation did not induce any significant modification of the cytotoxicity pattern although trends were noted to a lesser activity of fractionated light probably because the possibility of regrowth of undamaged cells as it was precedently observed with fractionated 20 J/cm^2 fluence. On cells incubated in higher concentrations (20 to 200 $\mu\text{g/ml}$), fractionation was found to tend to enhance the photodynamic activity on both cell lines.

In all cases, high HPD concentrations led to a lesser photodynamic activity as illustrated by the V-shape of the dose response curves. This phenomenon was more apparent when 60 J/cm^2 fluence was used and fractionation of light appeared to lower this phenomenon especially when 48 h were left between each fraction of 20 J/cm^2 .

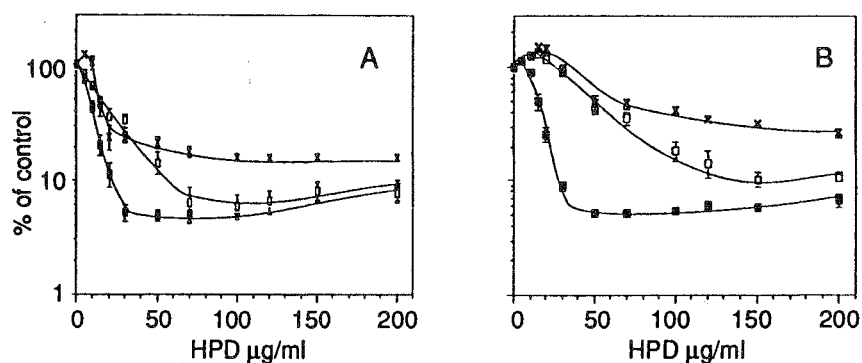


Figure 1 : Cytotoxicity of HPD-PDT on MCF-7 (A) and HT-29 (B) cells. 20 J/cm² total fluence is applied under continuous (■) or fractionated exposure in two (□) or three fractions (X) separated by 24 h. Mean values of triplicated experiments ± standard errors.

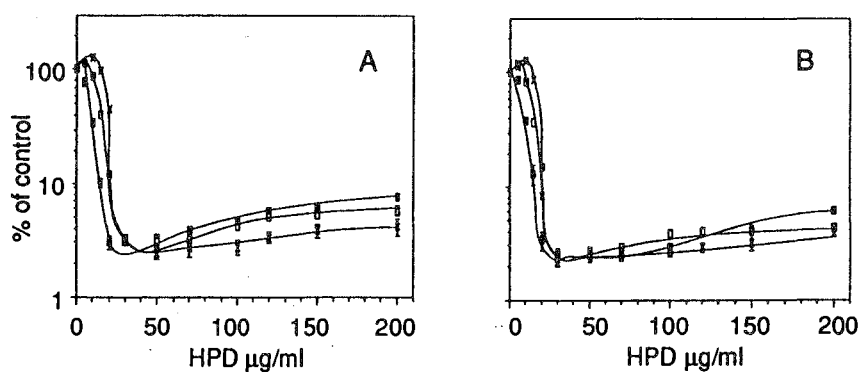


Figure 2 : Cytotoxicity of HPD-PDT on MCF-7 (A) and HT-29 (B) cells. 60 J/cm² total fluence is applied under continuous (■) or fractionated exposure in three fractions separated by 24 (□) or 48 h (X). Mean values of triplicated experiments ± standard errors.

Photobleaching of HPD

Flow cytometry analyses of cells continuously irradiated (table 2) revealed that the intracellular concentration of HPD was drastically affected by exposure to light because of photobleaching. 20 J/cm² induced a straight decay (35 to 58%) of the fluorescence and the inactivation of HPD was more intense when 60 J/cm² fluence was applied in single exposure especially for concentrations above 100 µg/ml.

		HPD ($\mu\text{g/ml}$)				
		20	50	100	150	200
20 J/cm ²	% photobleaching	0	34	52	60	63
	% photobleaching	16	57	63	63	62
60 J/cm ²	% inactivated HPD	-	60	80	82	85
3x20 J/cm ²	% inactivated HPD	-	40	74	83	87

Table 2: Flow cytometry analysis of the bleaching of HPD in cells exposed to 60 J/cm² in single or fractionated exposure and rates of inactivation of HPD on HT-29 cells determined from MTT assays with iso-effects calculation.

DISCUSSION

Many in vitro studies were already reported using conventional colony forming assays to determine the overall survival rates of cells exposed photodynamic treatment in time-consuming experiments [10]. Few experiments dealing with light fractionation [11-13] were reported and often lacked in direct comparisons between continuous and fractionated irradiation. In our previous paper [9], we demonstrated that MTT assays which we used in the present study, could yield reliable results and shorten the total duration of the experiments. The results presented in this paper showed that the cytotoxicity of PDT was maximal after 48h and depended on the total fluence up to 40 J/cm² where maximal values were reached, higher fluences being relatively less active because of the photobleaching of HPD. The present study was designed to investigate whether the fractionation of the light exposure could overcome this phenomenon and allow to reach higher levels of cytotoxicity. The schedule of light fractionation (24 or 48h between each fraction) was designed so that the cells were re-exposed to light before the maximal cytotoxicity was reached. The results obtained with a total light fluence of 20 J/cm² were consistent with our previous results [9] which demonstrated that fluences lower than 10 J/cm² had no cytotoxic effect on cells incubated in less than 20 $\mu\text{g/ml}$ HPD solutions. The lack cytotoxicity of each fraction would left undamaged cells able to further divide before the complete active light fluence was achieved and explained the increase in cell number obtained with low HPD concentrations and fractionated light exposure. This hypothesis appeared further justified since 3 fraction-exposure was less cytotoxic than 2 fraction- and than continuous-exposure. The difference noted between HT-29 and MCF-7 cells should be attributed to their mean doubling time which were respectively 24 and 36h and allowed quicker regrowth of sublethally damaged HT-29 cells than MCF-7. This results are in full agreement with those obtain by other groups using conventional clonogenic assays and strengthen the comparison that could be proposed between X-ray irradiation and PDT [12]. Using 60 J/cm² fluence in fractions of 20 J/cm² appeared interesting because of the possibility to reduce the photobleaching which is always developed with high HPD concentrations exposed to high fluences. Low HPD concentrations should be avoided since the photodynamic activity could be reduced, allowing the regrowth of the sublethally damaged tumor cells and finally impairing the efficacy of the treatment.

The present results emphasize the acute need of dosimetry for both photosensitizer and light in PDT. Pharmacological evaluation of HPD is needed to ensure that active intratumoral doses are reached as well as an optical evaluation of the tissues to optimise both doses of HPD and light which are limiting the efficacy of photodynamic treatments. Development of three dimensional models is under current investigation to allow the transposition of the results to humans.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the French "Ligue Nationale contre le Cancer" and performed within the INSERM Network of Scientists "Cancer Photochemotherapy".

REFERENCES

- 1 - Meunier A, Guillemin F, Kosminski P. The use of photodynamic therapy in the treatment of tumors of the upper aerodigestive tract. *Lasers Med. Sci.*, 1991, 6, 121.
- 2 - Patrice T, Foultier MT, Yactayo S, et al. Endoscopic photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative for primary treatment of gastrointestinal neoplasms in inoperable patients. *Digest. Dis. Sci.*, 1990, 35, 545-552.
- 3 - Sindelar WF, DeLaney TF, Tochner Z et al. Technique for photodynamic therapy for disseminated intraperitoneal malignant neoplasms. *Arch. Surg.*, 1991, 126, 318-324.
- 4 - Kessel D, Cheng ML. Biologic and biophysical properties of the tumor-localizing component of hematoporphyrin derivative. *Cancer Res.*, 1985, 45, 3053-3058.
- 5 - Coppola A, Viggiani E, Salzarulo L, Fasile G. Ultrastructural changes in lymphoma cells treated with hematoporphyrin and light. *Amer. J. Pathol.* 1980, 99, 175-180.
- 6 - Yanhua D, Xiaolin O, Zhongkang L, Hong L. Scanning electron microscopic observations on photodynamic effects on cells in vitro. *Lasers Med. Sci.*, 1990, 5, 375-379.
- 7 - Star WM, Marijnissen HPA, van der Berg-Blok AE, Versteeg JAC, Franken KAP, Reinhold HS. Destruction of rat mammary tumor and normal tissue microcirculation by hematoporphyrin derivative photoradiation observed in vivo in sandwich observation chambers. *Cancer Res.*, 1986, 46, 2532-2540.
- 8 - Kessel D, Thompson P, Musselman B, Chang CK. Chemistry of hematoporphyrin-derived photosensitizers. *Photochem. Photobiol.*, 1987, 46, 563-568.
- 9 - Merlin JL, Azzi S, Lignon D, Ramacci C, Zeghari N, Guillemin F. MTT assays allow quick and reliable measurement of the response of human tumor cells to photodynamic therapy. *Eur. J. Cancer*, 1992, in press.
- 10 - Dougherty TJ. Photodynamic therapy (PDT) of malignant tumors. *CRC Crit. Rev.*, 1984, 2, 83-116.
- 11 - Benstead K, Moore JV. The effect of fractionation of light treatment on necrosis and vascular function of normal skin following photodynamic therapy. *Br. J. Cancer*, 1988, 58, 301-305.
- 12 - Bellnier DA, Lin CW. Photosensitization and split-dose recovery in cultured human urinary bladder carcinoma cells containing non exchangeable hematoporphyrin derivative. *Cancer Res.*, 1985, 45, 2507-2511.
- 13 - Gibson SL, VanDerMeid KR, Murant RS, Raubertas RF, Hilf R. Effects of various photoirradiation regimens on the antitumor efficacy of photodynamic therapy for R230AC mammary carcinomas. *Cancer Res.*, 1990, 50, 7236-7241.

IN VITRO EVALUATION OF BLEACHING-MEDIATED LOSS OF PHOTODYNAMIC ACTIVITY OF HEMATOPORPHYRIN DERIVATIVE ON HUMAN TUMOR CELLS.

N. Zeghari¹, J.L. Merlin¹, D. Lignon¹, S. Marchal¹, C. Vigneron², F. Guillemin¹

Unité de Recherche en Thérapie Photodynamique, ¹Centre Alexis Vautrin, URA CNRS 821, ²Centre de Transfusion Sanguine, F-54511 Vandœuvre-les-Nancy Cedex, France.

INTRODUCTION

The fluorescence properties of porphyrin were first found useful for the detection of neoplastic sites [1]. Later it was demonstrated that illumination of sensitized tissues at an appropriate wavelength generated cytotoxic molecular species which led to the eradication of tumors [2]. Porphyrins as well as other agents [3, 4] can undergo photochemical reactions in which absorption of a photon induces the conversion of the electronic ground-state to the first excited singlet-state S_1 . Deactivation of this state can be achieved either by fluorescence or by intersystem crossing to triplet-state. The porphyrin triplet-state favours the photodynamic processus by energy transfert to oxygen and to other substrates which lead to production of singlet oxygen and radical forms directly involved in cell damage [4]. On another hand, porphyrins undergo photodegradation when exposed to light (photobleaching) altering both fluorescence and absorption properties of the photosensitizer [5,6,7]. Clinically, the main inconvenient of tumor diagnosis by fluorescence detection would be the photobleaching of the photosensitizer which would impair the efficiency of the further therapeutic phase. The present study was designed to investigate on cell models the biological consequences of hematoporphyrin derivative (HPD) photobleaching on the efficiency of photodynamic therapy (PDT).

MATERIAL AND METHODS

HT-29 cell line (colon carcinoma) was maintained at 37° C, 5 % CO₂ in Dulbecco's MEM supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS) (Sigma), penicillin and streptomycin. HPD was obtained from the Queen Elizabeth Hospital (Woodville, Australia). The light sources for the bleaching experiments were an argon pumped dye-laser (DL) (Spectra Physics 375 B) and a krypton laser (KL) (Spectra Physics 2020) emitting respectively at 630 nm and in the blue spectral range ($\lambda < 415$ nm). Cytotoxicity assays were performed according to Merlin et al. [8] using the MTT assays. Briefly, cells plated in 96-well plates (2.10⁴ cells per well) were incubated for 3h in HPD concentrations ranging from 10 to 200 µg/ml, then washed with fresh medium before being successively exposed to KL at 0.01-0.5 J/cm² and/or to DL at 20 J/cm² (KL+DL assays). The influence of KL exposure on the DL photodynamic activity was evaluated in comparing KL+DL assays with control DL assays. The photobleaching of HPD was evaluated as the loss in photodynamic activity after evaluation of the cytotoxicity.

50 μ l of 125 μ mol/l MTT (3-(4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma) was added into each well for 3 h at 37°C to allow MTT metabolisation. The formazan crystals were solubilized by adding 50 μ l of 25% SDS solution to each well. Absorbances were measured at 540 nm on a Multiskan plate reader (Flow Laboratories). Additivity of KL and DL cytotoxicities were estimated according to Steel and Peckham [9] from the respective survival rates obtained with each treatment used alone. The results were expressed as mean values of a minimum of 8 wells in triplicated assays.

Photobleaching rate was evaluated by means of intracellular HPD fluorescence monitoring [5, 7] after comparison with non-exposed controls using flow cytometry on a Orthocyte apparatus (Ortho Diagnostics Systems). Excitation was set at 488 nm and fluorescence was detected above 600 nm. KL+DL assays were compared to KL and DL assays. All the experiments were performed in triplicate.

RESULTS

Cytotoxicity assays

The relationships between cytotoxicity and fluences were determined from dose-response curves of sensitized HT-29 cells exposed to KL ($\lambda < 415$ nm) (data not shown). The laser krypton fluences to be used in combination with DL exposure (photobleaching experiments) were selected between 0.01 and 0.5 J/cm².

Exposure to KL at 0.01 J/cm² followed by DL at 20 J/cm²

No cytotoxicity appeared at 0.01 J/cm² and allowed direct estimation of the photobleaching rate in comparing KL+DL assays with DL assays.

Iso-effects HPD concentrations (Table 1) were found higher when cells were previously photoirradiated by KL. This decrease in efficiency might be due to the photobleaching of HPD although the fluence used (0.01 J/cm²) was quite low. From these results, the photobleaching appeared to depend on the concentration of HPD.

% control	HpD (μ g/ml)		
	DL	DL+KL	Difference %
5	45	70	55
10	35	45	28
20	30	38	26
30	25	30	20
40	22	25	13
50	18	20	11

Table 1:

HpD concentration required to achieve iso-effects with 20 J/cm² DL exposure or combined with 0.01 J/cm² KL. Differences were expressed as percentage of photoinactivated HpD.

Light exposure to KL at 0.5 and 0.25 J/cm² followed by DL at 20 J/cm²

At 0.5 and 0.25 J/cm², KL exposure induced cytotoxic effects. Because of the combined cytotoxicity of DL and KL, low photobleaching rate was not detected (data not shown). Comparing theoretical additive effects with experimental values, sub-additive effect was observed (Table 2).

Photobleaching rate was indirectly evaluated through the decrease of photodynamic activity and tended to depend on the fluence. For example, at 20 $\mu\text{g/ml}$, the decrease in activity was 53% for 0.5 J/cm^2 and 25 % for 0.25 J/cm^2 .

HPD $\mu\text{g/ml}$	DL	KL 0.25 J/cm^2				KL 0.5 J/cm^2			
		KL	KL +DL	% loss in activity		KL	KL +DL	% loss in activity	
0	100	100	100	(100-100)	-	100	100	(100-100)	-
5	90	100	90	(70-90)	-	100	90	(70-90)	-
10	90	97	77	(70-90)	-	95	85	(25-80)	33
20	50	80	40	(35-25)	25	90	35	(8-25)	53
30	18	65	17	(8-17)	47	25	13	(4-3)	73
50	9	50	9	(8-4)	33	8	12	(4-3)	74
70	5	40	3	(8-2)	20	4	6	(4-1)	82
90	3	22	2	(8-2)	20	3,5	4	(4-2)	42

Table 2 : Effect of combination of KL (0.25 J/cm^2 or 0.5 J/cm^2) with DL (20 J/cm^2). The figures in parentheses show the envelop of additivity calculated from the respective survival rates obtained with each photoradiation alone. Loss in activity was calculated from the difference between theoretical and experimental values.

Flow cytometry

Considering the results obtained with KL alone (table 3), the photobleaching of HPD only appeared at 0.15 J/cm^2 and was found to depend on both HPD concentration and fluence until cytotoxic fluences were reached (0.3 J/cm^2).

Above this value, the photobleaching did not appear to further depend on the HPD concentration and fluence values since no significant differences were further noticed.

In fact, the combination of highly cytotoxic fluences and concentrations (0.5 J/cm^2 and 100 $\mu\text{g/ml}$) altered the evaluation of photobleaching since it was exclusively assessed from the fluorescence of surviving cells which became less and less numerous as the fluence increased.

The photobleaching rates observed using KL (0.5 J/cm^2) or DL (20 J/cm^2) exposure alone (Table 4) were approximatively similar although the DL fluence was 40-fold higher than the KL fluence.

These results were in agreement with the absorption spectrum of HPD. Below 100 $\mu\text{g/ml}$, combination of the two lasers was found to induce a higher fluorescence decrease than the exposure to KL or DL alone.

Above 100 $\mu\text{g/ml}$, these results were not further confirmed because of the occurrence of high immediate cytotoxicity impairing the detection of fluorescence in surviving cells as encountered previously.

HpD $\mu\text{g/ml}$	Laser krypton fluences values (J/cm^2)						
	0.01	0.1	0.15	0.25	0.3	0.4	0.5
0	-	-	-	-	-	-	-
20	-	-	-	8 (2)	5 (2)	5 (2)	24 (7)
50	-	-	-	12 (6)	14 (1)	32 (3)	49 (3)
100	-	-	7 (3)	25 (7)	47 (7)	61 (6)	55 (8)
150	-	-	16 (7)	37 (5)	49 (5)	66 (7)	57 (6)
200	-	-	28 (5)	45 (4)	47 (4)	74 (3)	65 (9)

Table 3 : Photobleaching rate is expressed as a mean of HPD cellular fluorescence decrease evaluated by comparison with non-exposed samples. Mean of triplicated experiments (SD).

HpD $\mu\text{g/ml}$	% loss in cellular fluorescence				
	DL 20	0.25 J/cm^2		0.5 J/cm^2	
		KL	KL + DL	KL	KL + DL
0	-	-	-	-	-
20	-	8 (2)	38 (7)	24 (7)	27 (9)
50	34 (8)	12 (6)	55 (4)	49 (3)	64 (1)
100	52 (6)	25 (7)	59 (3)	55 (8)	68 (2)
150	60 (4)	37 (5)	60 (2)	57 (6)	58 (6)
200	63 (5)	45 (4)	65 (3)	65 (9)	58 (6)

Table 4 : Photobleaching rate determined by flow cytometry. Fluences were 0.25 and 0.5 J/cm^2 in KL and 20 J/cm^2 in DL. Mean of triplicated experiments (SD).

DISCUSSION

The present results, showing that the photobleaching rate appeared with lower fluences when HPD is exposed in the blue spectral range (KL, $\lambda \leq 415$ nm) than in the red light (DL, $\lambda = 630$ nm), were found in agreement with the absorption spectrum of HPD [10] and confirmed that the photodegradation of HPD is quite related to the absorbed quantity of light quanta. This phenomenon should be caused by the interaction of the porphyrin excited triplet state with oxygen to form singlet-oxygen which causes damage to the molecule of HPD [11]. Therefore, the present results might indicate that exposition to the light in the blue range could produce more singlet-oxygen than the red light. The cytotoxicity assays demonstrated that exposure of cells to KL then to DL impaired the cytotoxicity of DL photodynamic treatment. Inactivation rates were found higher than those detected by flow cytometry. For example, with 50 μg HPD/ml and exposition to KL (0.5 J/cm^2) then to DL, MTT assays revealed a 74% decrease in efficiency while cytometry analyses indicated only 64% decrease in fluorescence. Since different levels of photobleaching were found with the MTT assay and flow cytometry, singlet and triplet HPD state which are mainly involved respectively in cytotoxicity and fluorescence, might not be produced at the same rate. Because photobleaching occurs at lower fluence in regard of MTT results (15-fold less than with flow cytometry), compounds with higher triplet production and which are known to be implicated into cytotoxicity might be more sensitive to the photodegradation.

This is in agreement with the results of other groups who reported that a photoproduct like singlet-oxygen $^1\text{O}_2$ generated by energy transfert from the triplet porphyrin form to the molecular oxygen causes the photodegradation mainly to the porphyrin which generated it [7]. In addition, the results showed that singlet compounds with high fluorescence properties (high singlet state) seems less sensitive to photobleaching. These results are in agreement with the literature data reporting that the HPD components which are generating cytotoxicity has a quantum yield for the triplet state usually higher (above 0.7) than components generating high fluorescence whose quantum yield is less than 0.2 [12].

Additionally, the two methodologies that we used for evaluation of photobleaching indicate that a previous exposition to KL induce a significative photodegradation of HPD which is proportional both to the fluence and to the concentration of the photosensitizer, as previously reported by Grossweiner [13].

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by the French "Ligue Nationale contre le Cancer" and performed within the INSERM Network of Scientists "Cancer Photochemotherapy".

REFERENCES

- 1-Lipson R.L., Baldes E.J., Olsen A.B. The use of derivative of hematoporphyrin in tumor detection. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1961, 26:1-11
- 2-Dougherty T.J., Lawrence G., Kaufman J.H. et al. Photoirradiation in the treatment of recurrent breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1979, 62:231-237
- 3 -Kimel S., Tromberg B.J., Roberts W.G., Berns M.W. Singlet oxygen generation of porphyrins, chlorines and phtalocyanins. *Photochem. Photobiol.*, 1983, 50 :175-183
- 4-Laustriat G. Molecular mechanisms of photosensitization. *Biochimie*, 1986, 68:771-778
- 5 -Moan J. A change in the quantum yield of photoirradiation in cells observed during photodynamic treatment. *Lasers.Med. Sci.*, 1988, 3: 93-97
- 6 -Moan J., Rimington C., Malik Z. Photoinduced degradation and modification of photofrin II in cells in vitro. *Photochem. Photobiol.*, 1988, 47: 363-367
- 7 -Moan J., Berg K. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.*, 1991, 53: 549-553
- 8 -Merlin J.L., Azzi S., Lignon D., et al. MTT assays allow quick and reliable measurment of the response of human tumour cells to photodynamic therapy. *Eur J Cancer*, 1992, in press
- 9 -Steel G.G., Peckham M.J. Exploitable mechanisms on combined radiotherapy-chemotherapy : the concept of additivity. *J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1979, 5:85-91.
- 10 -Profio A. Laser excited fluorescence of haematoporphyrin derivative for diagnostic of cancer. *T. Quantum Electronics.*, 1984, 20: 1502-1506.
- 11-König K., Wabnitz H., Dietel W. Variation in the fluorescence decay properties of haematoporphyrin derivative during its conversion to photoproducts. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 1990, 8 : 103-111
- 12-Gomer C. J., Rucker N., Ferrario A., Wong S. Properties and applications of Photodynamic therapy. *Radiation Research.*, 1989, 120 : 1-18
- 13 -Grossweiner L.J. Optical dosimetry in photodynamic therapy. *Lasers. Surg. Med.*, 1986, 6:461-466

Quantum yields of photodegradation of protoporphyrin IX in solution : luminescent, spectrophotometric and biological testing of photobleaching

Lina Bezdetnaya^{1,2}, Nadia Zeghari¹, Muriel Barberi-Heyob¹,
Jean-Louis Merlin¹, Alexander Potapenko², François Guillemin¹

¹ Centre Alexis Vautrin, 54511 Vandoeuvre-Nancy, France.

² Dept. Medical and Biological Physics, Russian State
Medical University, Moscow, Russia.

ABSTRACT

In the present study, the biological testing of the photodegradation of protoporphyrin IX (PP IX) is proposed. The method implies preirradiation of PP IX ($\lambda < 415$ nm) in buffer solution (with or without serum) with the following adding to cells and irradiation of this mixture ($\lambda < 415$ nm). The increase in survival with increase in preirradiation fluence was used for estimation of rate and quantum yield of PP IX photobleaching in solutions. The quantum yield estimated by the proposed method was compared with quantum yields of photodegradation of PP IX by decay in absorbance and decay in fluorescence. The highest quantum yield of photodegradation of PP IX obtained by the test of cells photoinactivation, the lowest by the decay monitored by absorbance. The different values of quantum yield of photodegradation are discussed in the view of photobleaching of monomeric forms which much more photolabile than aggregates and of photoproduct formation. Biological testing of photodegradation of monomeric species of PP IX seems to be the most specific.

1. INTRODUCTION

Porphyrins are widely used in photodynamic therapy (PDT) of cancer, they are known to be degraded upon irradiation. This process often called "photobleaching" is of clinical importance. Since in vivo destruction of sensitizer can be either a disadvantage or an advantage^{1,2,3}. The evidence for porphyrins photodegradation is usually obtained by the reduced absorbance in a visible spectral band, the decrease in the fluorescence intensity or the formation of new emission bands. photooxidation products of the substrates.

The mechanism of photodegradation of porphyrins is complex and differs in solution and in various organized media. It has been shown that quantum yields of photobleaching of some porphyrins in aqueous solution are low but can be significantly increased in the presence of photooxidizable substrates (methionine, tryptophan, cysteine) and model electron acceptors¹. This photodegradation was monitored by the decay of Soret band. The presence of photooxidizable compounds cysteine, histidine, methionine and tryptophan also increased the rate of photobleaching of protoporphyrin IX (PP IX) in a microemulsion⁴. This was observed by the decay of absorbance at 507 nm. the increased rate of photobleaching was explained as a attack of the porphyrin macrocycle by reactive singlet oxygen photooxydation products of the substrates.

In the case of cells, loaded with porphyrins, the spectroscopic changes were explained by several reasons : photoinduced chemical modification of porphyrins without destruction of macrocycle; photodestruction of porphyrin macrocycle and photoinduced movement of the porphyrins to different locations in the cells^{5,6}.

It is well known that during photooxidation of porphyrins photoproducts appear^{7,8} which can be photodynamically active compound⁹. The spectral characteristics of such photoproducts can overlap with the parent compound. This complicates the interpretation of the results of photodegradation efficiency obtained by spectroscopic methods. Measurements of such type are

especially complicated in cells, taking into account the photoinduced movement of porphyrins in cells⁵.

In the present work, the new experimental approach is proposed for investigation of PP IX photobleaching in solutions. It implies preirradiation of PP IX in solutions with different fluences. Preirradiated PP IX was mixed with culture of tumor cells, the cells were irradiated in the presence of preirradiated PP IX. The increase in survival with increase in preirradiation fluence was used for estimation of PP IX photobleaching in solutions. This biological testing of PP IX photobleaching was compared with traditional estimation of PP IX photobleaching monitored by absorption and fluorescence.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals

Protoporphyrin IX (PP IX) disodium salt was obtained from Sigma. PP IX was dissolved in 5% glucose up to 100 µg/ml. This solution was further diluted in phosphate buffer saline (PBS) up to 5 µg/ml. For cell experiments, fetal calf serum (FCS; Dutsher, Brunath, France) was added, so that the final concentration of serum was 2% (V/V).

2.2. Cell culture

HT29, human colon adenocarcinoma cell line was used. The cells were inoculated in 75 cm² plastic tissue culture flasks in number of $2 \cdot 10^4$ cells/ml and maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Biochrom, Berlin, FRG) supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (FCS; Sigma), penicillin and streptomycin. The cells were kept 72h at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere to reach exponential growth then trypsinized to obtain cell suspensions. 200 µl of cell suspension containing $2 \cdot 10^4$ viable cells were plated per well into 96-well microtitre dishes. Cells were allowed to attach to the dishes for 48h at 37°C before being experimented.

2.3. Photoirradiation of PP IX samples

The light source was krypton laser (Spectra Physics 2020) emitting in the blue spectral range ($\lambda \leq 415$ nm) with two main bands at 405 and 413 nm. Solutions of PP IX (5 µg/ml in PBS with or without 2% FCS) were irradiated in plastic dishes of 35 mm diameter under different fluences (from 0.01 to 1.5 J/cm²), the fluence rate was 7.7 mW/cm².

2.4. Photoirradiation of cells

The medium from culture dishes were aspirated using a fine-point Pasteur pipet and cells were incubated for two hours in PP IX solution (5 µg/ml with 2% FCS previously irradiated or not). The medium was removed and cells washed twice with cold PBS to remove non-internalised PP IX. Complete medium was added to cells and the dishes underwent the irradiation at fluence of 0.5 J/cm² (krypton laser) and fluence rate of 31.4 mW/cm².

2.5. Cytotoxicity assays

According to Merlin *et al*¹⁰ the cells were kept for 48 hours at 37°C before the cytotoxicity was estimated using (4,5 Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT Sigma) assay. The assay is dependent on the mitochondrial reduction of MTT by succinate dehydrogenase system via coupling at two points along the cytochrome oxidase system¹¹. Only cells with active

mitochondria, i.e. metabolically viable cells can convert MTT to a blue formazan product which can be measured spectrophotometrically¹². MTT has been compared to clonogenic assay and good correlation between the two methods has been shown^{13,14}. After 48h light exposure, 50 μ l of 125 μ mol/l MTT was added into each well for 3 h at 37°C to allow MTT metabolism. MTT medium blank controls with no cells received also the same volume. After incubation, the formazan crystals were solubilized by adding 50 μ l of 25% sodium dodecyl sulfate solution into each well. Absorbance was measured at 540 nm on a Multiskan plate reader (Flow Laboratories). Absorbance of blank control was subtracted from the absorbance values in the other wells. The results were expressed as mean values of a minimum of 8 wells in triplicated assays. Cytotoxicity was evaluated as percentage of control values.

2.6. Fluorescence and absorption measurements:

Fluorescence measurements were recorded using a Perkin-Elmer LS50B luminescence spectrometer fitted with a red-sensitive photomultiplier (Hamamatsu R 928). Absorbance spectra were measured by means of a Perkin-Elmer Lambda Bio spectrophotometer.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Spectroscopic investigation

Under our conditions of solubilization PP IX presents as a highly aggregated compound. In Fig. 1 (curve 1), the absorption spectrum of PP IX in phosphate buffer saline (PBS) is presented. The Soret band is not observed and Q-band is red-shifted in comparison with Q-band in organic solution, known from literature^{15,16}. According to the literature data^{17,18}, the absence of Soret band is indicative for the complete aggregation of porphyrins. In the presence of 2% fetal calf serum (FCS) (Fig. 1, curve 2), a new maximum appears at 413 nm which corresponds to Soret band and most probably is due to partial disaggregation. The aggregated species of porphyrins are known to have weak fluorescent properties^{19,20}. Even in highly aggregated species, fluorescence is due to monomeric forms of porphyrins. Excitation fluorescence spectra of PP IX measured in the absence and presence of serum (Fig. 2) completely differ from absorption spectra. The Soret band is revealed in this spectra and is located at 397 nm in buffer solution of PP IX; in the presence of serum the Soret band is shifted to 411 nm and the intensity is significantly increased. The shape of fluorescence excitation spectra correlates to monomeric forms of PP IX, known in the literature^{15,16}. Therefore we can consider that in our solution only monomeric forms are responsible for fluorescence. Measuring of fluorescence spectra of PP IX in different environment can give additional information about photochemical activity of the dye, because fluorescence properties are known to correlate with photochemical ability of a pigment²¹. The fluorescence maximum of PP IX in buffer was around 621 nm (data not shown). In presence of serum, it shifted to 636 nm (Fig. 3, curve 1) and intensity increased nearly 6 times. Our results are in close agreement with those obtained by G. Lozovava¹⁵, where authors explained the maximum of fluorescence of PP IX in PBS at 618 nm through the formation of clusters, which nevertheless can be photochemically active. Presence of serum in the mentioned work, as well as in our case brought to the formation of water-soluble complexes of PP IX-protein. In fact, porphyrins are known to bind readily with ligand and binding affinity correlated with the tendency of porphyrins to aggregate. At the same time, when bound to protein, they are largely monomerized, and are still good producers of singlet oxygen on illumination. So, as follows from spectroscopic measurements of PP IX in aqueous solution the dye presents mainly in the form of aggregates (may be oligomers) with a small fraction of monomers. Only monomers are responsible for fluorescence. Presence of macromolecular carrier (FCS) increases the monomerization and as a consequence the fluorescence is strongly enhanced.

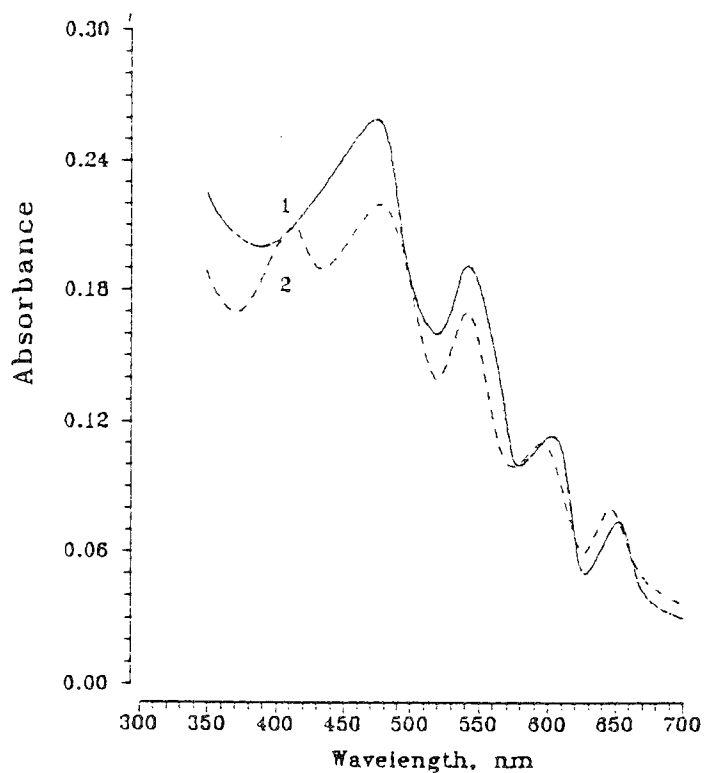


Figure 1: Absorption spectra of protoporphyrin IX (5 µg/ml) in phosphate buffer.
1 without serum, 2 with 2% of fetal calf serum (FCS).

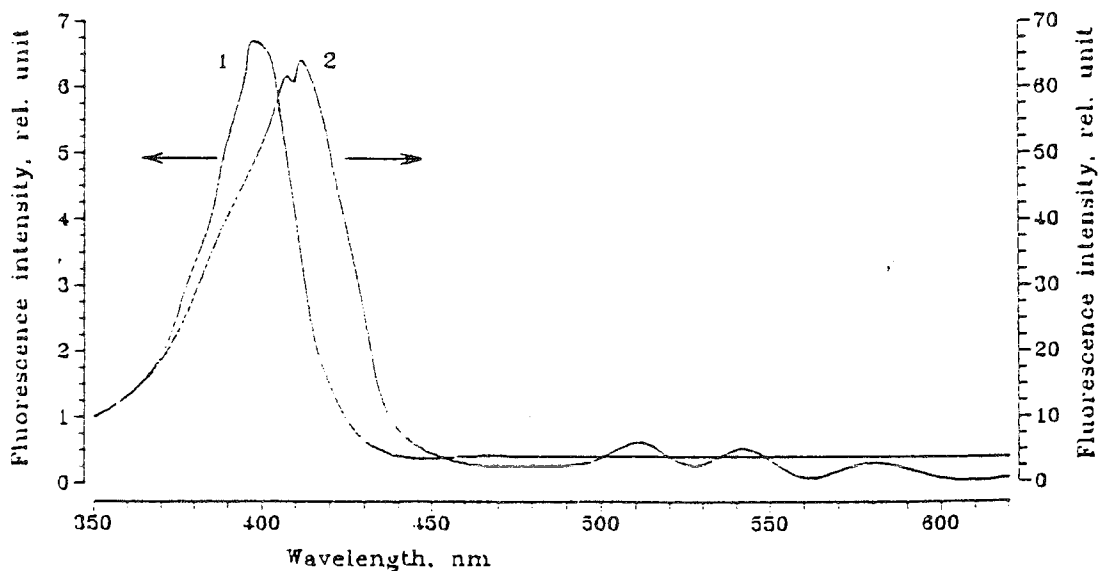


Figure 2: Fluorescence excitation spectra of protoporphyrin IX (5 µg/ml) in phosphate buffer.
1 without serum (detected at 620 nm), 2 with 2% of FCS (detected at 634 nm)..

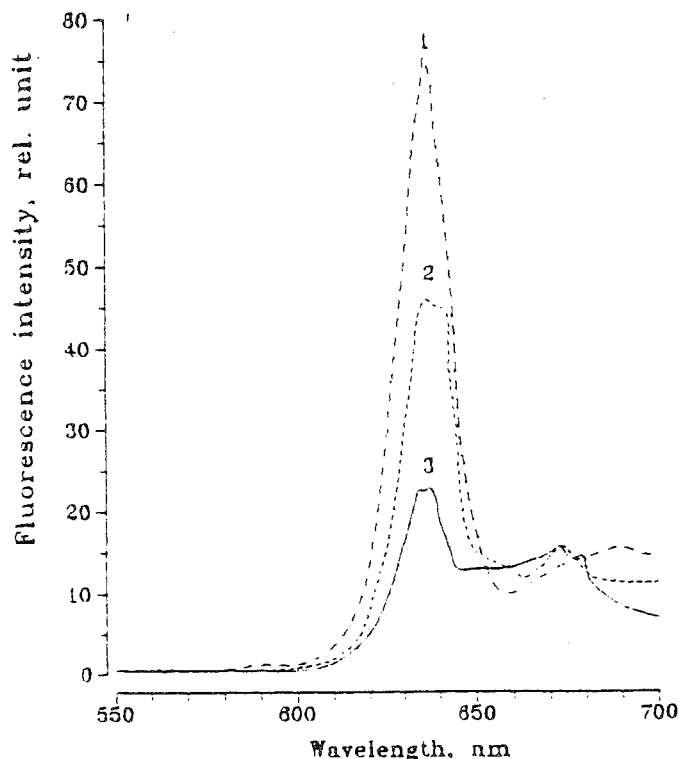


Figure 3: Fluorescence spectrum of protoporphyrin IX (5 µg/ml) in phosphate buffer.
in presence of serum ($\lambda_{exc} = 405 \text{ nm}$)

3.2. Spectroscopic study of photodegradation of PP IX with and without serum.

3.2.1. Decay of absorbance.

Decay of absorbance of PP IX in solution observed during light exposure was monitored at wavelength 413 nm and 405 nm (with and without serum, respectively). From the initial parts of the curves, the rate of photodegradation, as well as quantum yield (QY) was calculated (Table 1). The quantum yield of photobleaching appeared to be quite low (1.4×10^{-5}) in buffer solution for PP IX, but increased strongly in the presence of serum (2.6×10^{-4}). Nearly the same order of QY of photodegradation followed by decay of absorbance is known for other porphyrins in aqueous solutions, including hematoporphyrin (HP) and Photofrin II¹ (PF II). It is known that photobleaching of HP²⁴ and PF II²⁵ is increased in the presence of human serum albumin (HSA). The presence of photooxidizable substrates also significantly increased the rate of photobleaching for PP IX in microemulsion⁴. Most probably, only monomeric forms of PP IX undergoes quick photodegradation, therefore in the presence of serum the QY of photodegradation increases. Indeed, analysis of difference absorption spectra of preirradiated PP IX against PP IX shows that wavelength dependence of decay in absorbance is close to the fluorescence excitation spectra with differences never exceeding 2 nm (data not shown). This coincidence indicates that only disaggregated forms of PP IX are photolabile, while aggregates are essentially more stable.

3.2.2. Decay of fluorescence

Decay of fluorescence of PP IX during irradiation was monitored in maxima at $\lambda = 620$ nm (solution of PP IX in buffer) and $\lambda = 636$ nm (buffer solution of PP IX with serum). The rate of photodegradation and quantum yields measured from the initial parts of the curves are presented in Table 1. The decay of fluorescence in the presence of serum is nearly 50 times higher than without serum. This difference is likely due to monomerization of PP IX in the presence of serum and bleaching of monomeric forms. The fluorescence yield is known to be higher for monomers than that for aggregates, what was shown for HP²⁶. The fact is, that in aggregates singlet state quenching takes place responsible for the lower fluorescence yield²⁶. From the data of Table 1, appears that the rate of decay of fluorescence of PP IX with serum is about an order of magnitude higher than decay of absorbance under the same conditions of irradiation. The reasons of such difference are the following : when we monitor photobleaching by fluorescence, we measure practically only monomeric forms of dye, while aggregates are not fluorescent. Quite different situation we have in the case of absorbance measurement : absorbance mainly belongs to aggregated forms, which are photochemically stable, and too much less extend to monomeric photolabile forms. This is why, the rate of relative decrease in absorbance during irradiation is much lower than rate of decrease of fluorescence. It may be proposed that estimation QY monitored by fluorescence is lower than in reality. One may notice that simultaneously with decrease in fluorescence intensity, the shape of fluorescence band changes upon irradiation (Fig 3), which strongly indicate that fluorescence spectrum of initial PP IX overlaps with emission spectra of some photoproducts. Therefore any conclusion concerning photodegradation of PP IX made by the decay of fluorescence may not reflect the real rate of photobleaching of sensitizer.

Table 1: Rate and quantum yield of photodegradation of PP IX in solutions with and without serum estimated by three different methods: absorbance, fluorescence and cell photoinactivation-test. Quantum yields of photobleaching were calculated as (initial rate of disappearance of PP IX) / (initial rate of absorption of photons by the reaction mixture).

Pp IX in:	<i>Absorbance</i>		<i>Fluorescence</i>		<i>Cell photoinactivation-test</i>	
	Rate (cm ² /J)	Quantum yield	Rate (cm ² /J)	Quantum yield	Rate (cm ² /J)	Quantum yield
PBS	0.004 ± 0.001	1.4 · 10 ⁻⁵	0.02 ± 0.004	6.2 · 10 ⁻⁵	0.112 ± 0.02	3.7 · 10 ⁻⁴
PBS (+ 2% FCS)	0.08 ± 0.01	2.6 · 10 ⁻⁴	0.91 ± 0.17	2.9 · 10 ⁻³	2.33 ± 0.55	7.7 · 10 ⁻³

3.3. Decay in cell photoinactivation

A new test-system is proposed for investigation of photodegradation of porphyrins in solutions in comparing the survival of HT29 cells being incubated in PP IX preirradiated or not. The dose-response curve of survival is presented in Fig. 4. The fluences of preirradiation of PP IX are plotted on abscissa. The data of typical experiment are presented in Fig. 4. It is seen that at fluences of 0.3 J/cm² and higher the survival reaches plateau at about 90% and do not increase any more. This 10% lethal effect is due to dark cytotoxic properties of PP IX at concentration used in our experiment.

To evaluate the concentration of PP IX remaining after first irradiation the following approach was used. We estimated the concentration dependency of phototoxic effect of PP IX from the concentration-response curve for cell cytotoxicity (Fig. 5). From this data, the concentration of PP IX, which corresponds to the given level of survival in Fig. 4 was calculated. This calculated

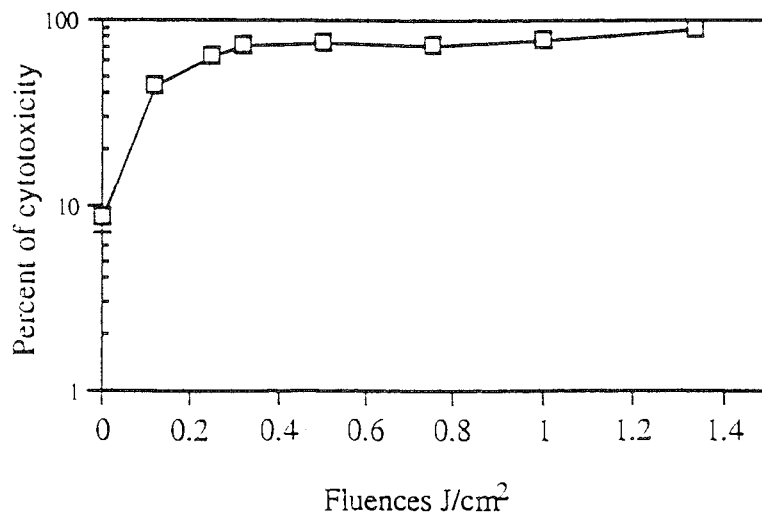


Figure 4 : Dose-Response curve of cytotoxicity in HT29 cells. Cytotoxicity is plotted versus preirradiation fluence of PP IX (5 $\mu g/ml$) in the presence of serum. Cytotoxicity was estimated by MTT test. Data of typical experiment out of five are presented.

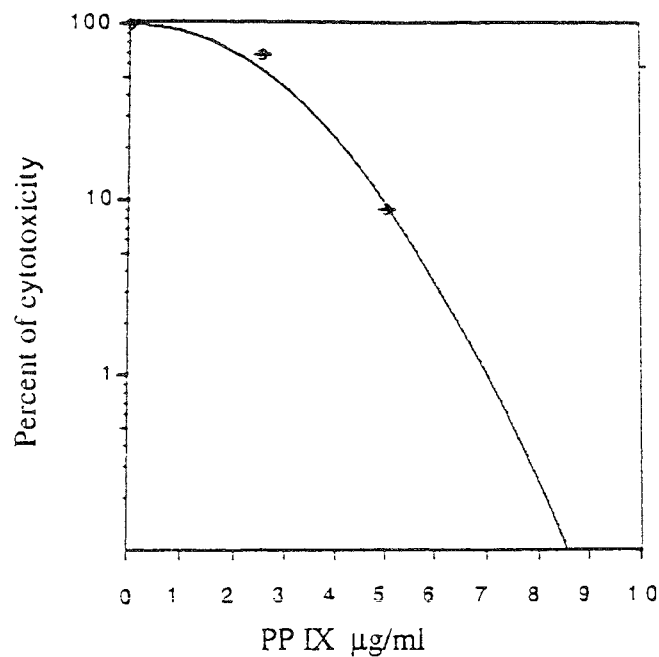


Figure 5 : concentration dependence of phototoxic effect of PP IX. Irradiation was done at the fluence 0.5 J/cm^2 ($\lambda < 415$ nm).

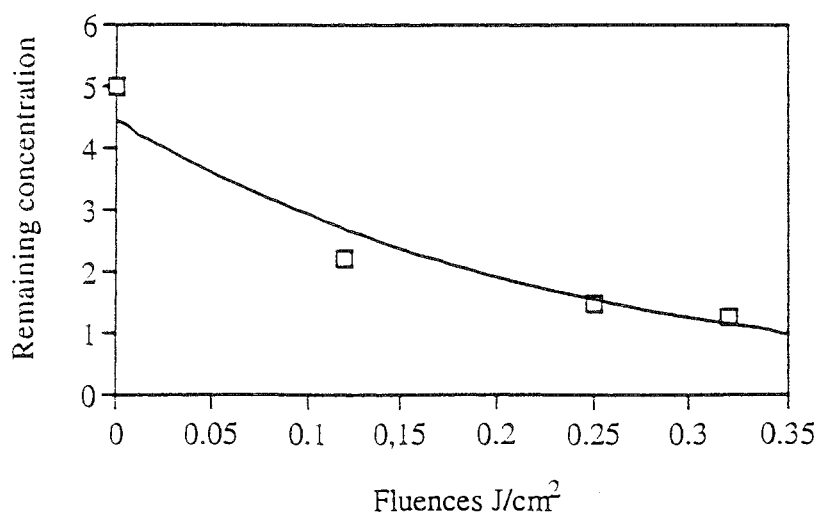


Figure 5 : Remaining concentration calculated from the concentration-response relationship for cell cytotoxicity versus PP IX preirradiation fluence. Buffered solutions of PP IX ($5 \mu g/ml$) were irradiated in the presence of 2% FCS.

concentration of remaining unbleached PP IX was plotted as a function of fluences of preirradiation Fig. 5. From initial part of the curve the rate and QY of photodegradation was estimated (Table 1). The QY of degradation followed by cell inactivation appeared to be 7.7×10^{-3} . Thus, the comparative analysis photodegradation of aqueous solution of PP IX in the presence of serum monitored by three methods : decay in absorbance in Soret band, decay in fluorescence and decay in cell inactivation showed that highest quantum yield of photodegradation was in the latter case.

4. CONCLUSION

The problem of photodegradation of sensitizers, used in PDT is very important in the view of clinical dosimetry². As the drugs usually used for PDT-treatment, such as hematoporphyrin derivative (HpD) or PF II, are complex mixtures, containing oligomeric, dimeric and monomeric species the interpretation of the results of photobleaching studies with these sensitizers is difficult. Therefore, in the present study we investigated photodegradation of PP IX, which is known to be highly cytotoxic. Moreover, this sensitizer is of big interest as a mediator of 5-aminolevulinic acid (ALA) - induced photodynamic therapy²⁷. To simulate the situation encountered in vivo where the sensitizer interacts with body fluids, photodegradation was examined not only in buffer solution, but also in the presence of serum proteins contained in fetal calf serum (FCS).

The comparison of QY of photodegradation of PP IX in solution (with and without serum) by three applied methods : decay in absorbance, decay in fluorescence and decay in cell

photoinactivation points to several facts. First of all, photobleaching of PP IX significantly increases in the presence of serum, measured by either of the three methods.

Our spectroscopic experiments with PP IX are consistent with the fact that porphyrins are known to be largely monomerized when bound to protein²⁸. From the other side, PP IX in monomeric form is most photolabile and increased photolability correlates with higher QY of fluorescence and generation of singlet oxygen^{16,20}. In aggregated species internal crossing is increased due to this fluorescence and intersystem crossing are decreased. From this data follows that under irradiation of PP IX (with or without serum) the photobleaching of monomers presumably takes place. This is why efficiency of photobleaching is much higher in the presence of serum.

The most interesting result of present work is that QY of photodegradation of PP IX estimated by mentioned three methods are significantly different between themselves. So, QY of photodegradation of PP IX, irradiated in the presence of serum and estimated by decay in absorbance was 2.6×10^{-4} ; data from decay of fluorescence gave a value one order of magnitude higher (2.9×10^{-3}). In the work of J. Moan⁹ the decays in absorbance, fluorescence and photosensitizing effect of Pf II were compared and rate of sensitizing efficiency was found to be lowest. The highest was decay of fluorescence. The data of this work cannot be compared with our data because of principal different conditions of experiment: the fluorescence, absorbance was measured directly in cells, photosensitizing efficiency was estimated as a result of simultaneous irradiation of cells with Pf II. In our model of photobleaching, we study the rate of photodegradation in solution, without cells.

The biological test-system of photobleaching presented in our work appeared to be the most sensitive.

The main drawback of spectrophotometric method is that we measure absorbance, which belongs to photostable aggregates. Fluorescence method is better, because in this case we estimated the fluorescence of monomers. But emission band of PP IX overlaps with emission band of photoproduct, and due to this total luminescence decays slower than the concentration of monomeric PP IX. But probably, this photoproduct is not so phototoxic as parent PP IX. Due to this, biological testing of photobleaching of monomeric PP IX is the most specific and gives the highest QY.

Our preliminary results have shown that storage of preirradiated PP IX during 24 hours results to the gradual increase of their fluorescence. Most probably, we deal with monomerization and appearance of monomers due to disaggregation. It seems to be that after bleaching of monomers the equilibrium between monomeric and aggregated species is established, but this process is time-consuming and lasts much longer than the time of our experiment.

5. REFERENCES

1. J.D. Spikes, "Quantum yields and kinetics of the photobleaching of hematoporphyrin, photofrin II, tetra (4-sulfonatophenyl)-porphyrine and uroporphyrin", *Photochem. Photobiol.*, vol. 55, pp. 797-808, 1992.
2. W.R. Potter, T.S. Mang and T.J. Dougherty, "The theory of photodynamic therapy dosimetry: consequences of photodestruction of sensitizer", *Photochem. Photobiol.*, vol. 46, pp. 97-101, 1987.
3. D.G. Boyle and W.R. Potter, "Photobleaching of photofrin II as mean of eliminating skin photosensitivity", *Photochem. Photobiol.*, vol. 46, pp. 997-1001, 1987.
4. M. Krieg and D. Whitten, "Self-sensitized photo-oxidation of proporphyrin IX and related porphyrins in erythrocytes ghosts and microemulsions: a novel photooxidation pathway involving singlet oxygen", *J. of Photochemistry*, vol. 25, pp. 235-252, 1984.
5. J. Moan, "A change in the quantum yield of photoinactivation of cells observed during photodynamic treatment", *Lasers in Med.Sci.*, vol. 3, pp. 93-97, 1989.

6. J. Moan, "Effect of bleaching of porphyrin sensitizers during photodynamic therapy", *Cancer Letters*, vol. 33, pp. 45-53, 1986.
7. G.S. Cox, C. Bobillier and D. Whitten, "Photooxidation and singlet oxygen sensitization by protoporphyrin IX and its photooxidation products", *Photochem. Photobiol.*, vol. 36, pp. 401-407, 1982.
8. K. König, H. Schneckenburger, A. Ruck and R. Steiner, "In vivo photoproduct formation during PDT with ALA-induced endogenous porphyrin", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, vol. 18, pp. 287-290, 1992.
9. L. Giniunas, R. Rotomskis, V. Smilgevicius, A. Riskarskas, J. Didziapetrenė, L. Blozneltyte and L. Grigute, "Activity of haematoporphyrin derivative photoproduct in photodynamic therapy in vivo", *Lasers in Med. Sci.*, vol. 6, pp. 425-428, 1991.
10. J.L. Merlin, S. Azzi, D. Lignon, C. Ramacci, N. Zeghari and F. Guillemin "MTT assays allow quick and reliable measurement of the response of human tumour cells to photodynamic therapy", *Eur. J. Cancer*, vol. 9, pp. 1452-1458, 1992.
11. T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival", *J. Immunol. Methods*, vol. 65, pp. 55-63, 1983.
12. J. Carmichael, W.G. DeGraff, A.F. Gazdar, J.D. Minna and J.B. Mitchell "Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing", *Cancer Res.*, vol. 47, pp. 936-942, 1987.
13. L.M. Weinsenthal, P.L. Dill, N.B. Kurnick et al "Comparison of dye exclusion assay with clonogenic assay in the determination of drug induced cytotoxicity", *Cancer Res.*, vol. 43, pp. 258-264, 1983.
14. A.G. Bosanquet, M.C. Bird and E.D. Gilby. "In vitro determination of tumor chemosensitivity in haematological malignancies", *Haematol. Oncol.*, vol. 3, pp. 1-10, 1985.
15. G. Lozovaya, Z. Masinovsky and A.A. Sivash, "Photoporphyrin IX as a possible ancient photosensitizer : spectral and photochemical studies", *Origins of Life and Evolution of Biosphere*, Kluwer Academic Publishers, vol. 20, pp. 321-330, 1990.
16. S. Yu. Egorov, A.A. Krasnovsky, I.A. Safonova, M.I. Bistrova, A.A. Krasnovsky, senior, "Photogeneration of singlet oxygen by pigments - precursors of chlorophyll", *Dokl. AN SSSR*, vol. 289, pp. 1266-1270, 1988 (in Russian).
17. S.B. Brown, M. Shillcock, P. Jones, "Equilibrium and kinetic solution", *Biochem. J.*, vol. 153, pp. 279-285, 1976.
18. I.B. Melo and G. Reisaeter, "The physicochemical state of protoporphyrin IX in aqueous solution investigated by fluorescence and light scattering", *Biophysical Chemistry*, vol. 25, pp. 99-104, 1986.
19. J. Moan, "The photochemical yield of singlet oxygen from porphyrins in different states of aggregation", *Photochem. Photobiol.*, vol. 39, pp. 445-449, 1984.

20. A. Andreoni, R. Cubeddu, S. De Silvestri, G. Jori, P. Laporta and E. Reddi, "Time-resolved fluorescence studies of hematoporphyrin in different solvent system", *Z. Naturforsch.*, vol. 38, pp. 83-89, 1983.
21. J. Moan and S. Sommer, "Action spectra for hematoporphyrin derivative and photofrin II with respect to sensitization of human cells in vitro to photoinactivation", *Photochem. Photobiol.*, vol. 40, pp. 631-634, 1984.
22. E. Tipping, B. Ketterer, P. Koskelo, "The binding of porphyrins by ligandin", *Biochem. J.*, vol. 164, pp. 509-516, 1978.
23. J. Davila and A. Harriman, "Photoreactins of macrocyclic dyes bound to human serum albumin". *Photochem. Photobiol.*, vol. 51, pp. 9-19, 1990.
24. P. Richard, A. Blum and L.I. Grossweiner, "Hematoporphyrin photosensitization of serum albumin and subtilizin BNP", *Photochem. Photobiol.*, vol. 37, pp. 287-291, 1983.
25. W.G. Roberts, K.M. Smith, J.L. McCullough and M.W. Berns, "Skin photosensitivity and photodestruction of several potential photodynamic sensitizer", *Photochem. Photobiol.*, vol. 49, pp. 431-438, 1989.
26. G.J. Smith, "The effects of aggregation on the fluorescence and the triplet state yield of hematoporphyrin", *Photochem. Photobiol.*, vol. 41, pp. 123-126, 1985.
27. J.C. Kennedy, R.H. Pottier and D.C. Pross, "Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX : basic principles and present clinical experience", *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, vol. 6, pp 143-148, 1992.
28. G. Jori, "Photosensitized processes in vivo : proposed therapeutic applications", *Photochem. Photobiol.*, vol. 52, pp 439-443, 1990.

Nom, Prénom : Z E G H A R I Nadia

Nature de la thèse :

Doctorat de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1
en Biologie et Santé

VU, APPROUVE ET PERMIS D'IMPRIMER

Nancy, le 8 DEC. 1995 n° 480

Le Président de l'Université Henri Poincaré, Nancy 1

Jean Pierre FINANCE



UNIVERSITÉ HENRI POINCARÉ-NANCY I

ÉCOLE DOCTORALE «BIOLOGIE ET SANTÉ»

THÈSE

Présentée et soutenue publiquement

le 13 novembre 1995

CARACTÉRISATION ET ÉTUDE DES CONSÉQUENCES BIOLOGIQUES DU PHOTOBLEACHING DE L'HÉMATOPORPHYRINE DÉRIVÉE UTILISÉE EN THÉRAPIE PHOTODYNAMIQUE

RÉSUMÉ

La photodégradation de l'hématoporphyrine dérivée (HpD) est caractérisée par une modification du spectre d'absorption, une diminution de l'intensité de fluorescence, ainsi qu'une altération du pouvoir de photoinactivation cellulaire. A partir de ces trois critères, seront évaluées les constantes de photodégradation de l'HpD dans deux environnements biologiques différents.

In vitro: sur solutions d'HpD supplémentées de sérum (2%). Le taux de photodégradation le plus important est obtenu à partir des essais de cytotoxicité cellulaire (test au MTT) suggérant que le système biologique d'estimation du photobleaching est le plus sensible.

In vivo: sur tumeurs HT29 greffées sur souris et exposées à différentes fluences en lumière bleue ou en lumière rouge. Malgré sa faible profondeur de pénétration dans les tissus, la lumière bleue induit un taux de photodégradation supérieur à celui de la lumière rouge et elle semble par ailleurs réagir selon un processus radicalaire qui gagnerait tout le volume tumoral.

L'HpD étant proposée en thérapie photodynamique (PDT) pour le diagnostic et le traitement des néoplasies, notre second objectif est de démontrer *in vitro* et *in vivo* si l'illumination de l'HpD à visée de diagnostic ($\lambda < 415$ nm) peut altérer l'efficacité de l'étape thérapeutique successive ($\lambda = 630$ nm).

In vitro: les essais sur culture de cellules ont démontré que l'exposition séquentielle aux deux lumières diminuait la cytotoxicité. Cette interaction négative peut être modifiée par la production de photoproduits avec une faible activité photodynamique dont l'existence a été confirmée par la détection de nouveaux pics d'absorption et de fluorescence.

In vivo: L'évolution du volume tumoral après exposition séquentielle aux deux lumières est plus rapide que celle des témoins exposés à une seule photoirradiation. Aucune relation directe ne permet de lier l'altération de l'activité photodynamique aux résultats obtenus par les autres méthodes d'évaluation du photobleaching. Seule l'évaluation des conséquences biologiques peut fournir une réponse objective.

MOTS CLÉS:

Hématoporphyrine dérivée (HpD), Thérapie photodynamique (PDT), Photobleaching.
