



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>

UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I
FACULTE DE MEDECINE

THESE
Pour obtenir le grade de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE HENRI POINCARE-NANCY I

Ecole doctorale BioSE (Biologie - Santé - Nutrition)
Discipline : Biologie cellulaire et Nutrition

Sophie MARCHAL

**Stratégies pro-apoptotiques appliquées au traitement photodynamique
avec le Foscan® de modèles précliniques d'adénocarcinome humain**

Thèse dirigée par : Dr Lina BEZDETNYA-BOLOTINE

Présentée et soutenue publiquement le 27 juin 2008

JURY

Président:	Pr Jean-Louis MERLIN (Nancy)
Examineurs:	Dr Lina BEZDETNYA-BOLOTINE (Nancy) Pr Frédéric MARCHAL (Nancy) Pr Alexander POTAPENKO (Moscou, Russie)
Rapporteurs:	Pr Patrizia AGOSTINIS (Leuven, Belgique) Pr Jean-Pierre SOUCHARD (Toulouse)

REMERCIEMENTS

Monsieur le Professeur Guillemin

Toutes ces années passées à parfaire mon parcours scientifique au Centre Alexis Vautrin m'ont permis d'apprécier la pertinence de vos interventions, déterminante dans la démarche scientifique de notre équipe. Grâce à vous, cette désormais célèbre interrogation : « Quelle est la question ? » est le préalable à toutes nos réflexions et le garde-fou à toutes nos spéculations. Merci d'insuffler à notre équipe cet esprit d'exigence nécessaire à la qualité de nos travaux.

Monsieur le Professeur Frédéric Marchal,

Vous avez accepté, avec la gentillesse qui vous caractérise, de prendre part à ce jury. L'occasion m'est donnée de vous exprimer la sincère estime que je vous porte depuis notre collaboration au sein de cette équipe du CRAN que vous avez rejointe depuis peu. Merci de m'accorder un peu de votre précieux temps, en espérant qu'il soit profitable.

Madame le Docteur Lina Bolotine-Bezdetnaya,

Vos sujets d'intérêt ne vous destinaient pas à vous plonger dans le monde complexe de l'apoptose. Vous y avez accordé beaucoup de temps et votre ténacité a été un élément décisif dans ma décision d'entreprendre cette thèse. Travailler avec vous, toujours dans la bonne humeur, c'est apprendre l'exigence et la précision scientifique. Merci pour tous ces échanges instructifs qui enrichissent mes journées de travail.

Madame le Professeur Patrizia Agostinis,

Your team's works is of such a good quality in the field of the mechanisms of cell death induced by the oxidative stress particularly by hypericin-PDT, that you could not be ignored as a reviewer of this thesis. So, it is a great honour that you accepted this hard job. I wish to express my most sincere thanks for the careful attention you paid to this French manuscript.

Monsieur le Professeur Jean-Pierre Souchard,

Bien que chimiste, vous avez accepté de juger ce travail au nom de la thérapie photodynamique, ce domaine de recherche si restreint en France que la poignée de chercheurs qui s'y attardent ont toujours beaucoup de plaisir à se côtoyer au hasard des thèses, congrès et autres séminaires. Merci pour le temps que vous aurez passé à lire ce manuscrit pour en dégager le bon et le moins bon, en espérant que cette lecture vous soit agréable et instructive.

Monsieur le Professeur Alexander Potapenko,

It was so kind of you to accept a part in the responsibility for the judgment of this thesis. So thankful to you. I hope to benefit from both your knowledge and your sense of humour for still a long time.

Monsieur le Professeur Jean-Louis Merlin,

Votre présence dans ce jury m'honore et me fait surtout immensément plaisir. Travailler à vos côtés a été formateur et tellement agréable ! Aujourd'hui, à l'instar de la transduction du signal, nos sujets d'intérêt ont pris des voies différentes mais, la finalité restant la même, votre appréciation sur ce travail de thèse m'est précieuse. Merci.

Merci à l'ensemble des personnes qui composent notre équipe pour les efforts consentis lors des exposés de nos travaux, suscitant ainsi des remarques souvent constructives. J'adresse en particulier de vifs remerciements à **Aurélié François** pour son assistance technique efficace.

Merci également à ma fille, **Aude Bressenot**, qui me prête régulièrement ses yeux d'anatomo-pathologiste et à **M. le Professeur Plénat**, chef du service d'anatomie et de cytologie pathologiques du CHU de Brabois pour ses conseils et l'assistance technique qu'il met à notre disposition.

Je tiens également à remercier les **comités lorrains de La Ligue Contre le Cancer** dont le soutien financier est précieux pour la réalisation de nos recherches.

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	6
-----------------------------	---

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	8
--------------------------------	---

1. LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE

1.1. Historique	8
1.2. Les réactions photochimiques	9
1.2.1. Les réactions photochimiques de type I	10
1.2.2. Les réactions photochimiques de type II	12
1.3. Mécanismes liés à l'oxygène	14
1.3.1 Réactions d'oxydation générées par l'oxygène singulet en milieu cellulaire	14
1.3.2. La photodégradation des photosensibilisateurs	15
1.3.3. La consommation en oxygène au cours de la PDT	16
1.3.4. Modulation des mécanismes de la PDT par l'irradiance	19
1.4. Les mécanismes de photodestruction des tumeurs par la PDT	21
1.4.1. Dommages cellulaires	21
1.4.2. Dommages vasculaires	22
1.4.3. Réponse immunitaire	22
1.5. Les photosensibilisateurs	23
1.5.1. Propriétés idéales d'un photosensibilisateur	23
1.5.2. Les photosensibilisateurs de deuxième et de troisième génération	23
1.5.3. Localisation des photosensibilisateurs	25
1.5.3.1. Localisation intracellulaire	25
1.5.3.2. Localisation intratissulaire	27

2. LE FOSCAN® (META-TETRA(HYDROXYPHENYL)CHLORINE, m-THPC, TEMOPORFIN)	27
---	----

2.1 Données pharmacocinétiques	29
2.2 Contribution de l'oxygène singulet dans l'effet cytotoxique de la PDT avec le Foscan®	31
2.3. Modulation par l'irradiance de l'effet thérapeutique de la PDT avec le Foscan®	32
2.4. Localisation subcellulaire du Foscan® et sites primaires des dommages photoinduits	32
2.5. Modalités de mort cellulaire	33

3. L'APOPTOSE	34
---------------------	----

3.1. Définition	35
3.2. Les caspases	36
3.2.1. Définition et classification	36
3.2.2. Activation des caspases	37
3.2.3. Régulation des caspases	40
3.3. La voie intrinsèque	41
3.3.1. Protéines de la famille Bcl-2	41
3.3.2. Molécules d'origine mitochondriale	44

3.3.3. Rôle de p53	45
3.3.4. Signalisation dépendante du stress du réticulum endoplasmique	46
3.4. La voie extrinsèque	51
3.5. Régulation de l'apoptose	53
3.6. Phagocytose des cellules apoptotiques.....	54
4. L'APOPTOSE INDUITE PAR LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE	55
4.1. La mitochondrie cible privilégiée de la thérapie photodynamique	57
4.2. Rôle du stress oxydant du RE dans l'apoptose photo-induite	59
4.3. Implication de p53 dans l'apoptose induite par la PDT	61
4.4. Voie extrinsèque dépendante des récepteurs de mort cellulaire.....	62
4.5. Place de l'apoptose dans la mort cellulaire induite par la PDT.....	62
4.5.1. Mort cellulaire programmée de type II : l'autophagie.....	63
4.5.2. Mort cellulaire programmée de type III : la nécrose	63
4.6. L'apoptose photo-induite <i>in vivo</i>	64
4.7. Evaluation des techniques de marquage de l'apoptose en histologie	67
OBJECTIFS	70
RESULTATS.....	71
1. CARACTERISTIQUES DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE AVEC LE FOSCAN®	71
1.1. Importance de l'apoptose photoinduite par le Foscan® dans la mort des cellules HT29. Implication de la mitochondrie	71
1.2. Modulation de l'apoptose photoinduite dans les sphéroïdes HT29 par l'irradiance	71
1.3. Relation entre la localisation subcellulaire du Foscan® et l'activation des caspases dans les cellules MCF-7 photosensibilisées	83
1.3.1. Influence de la durée d'incubation des cellules avec le Foscan® sur la localisation subcellulaire du photosensibilisateur.....	83
1.3.2. Relation entre le stress oxydant du réticulum endoplasmique et l'activation des caspases suite au traitement par Foscan®-PDT	84
2. DETECTION EN IMMUNOHISTOLOGIE DE L'ACTIVATION DES CASPASES -3 ET -7	94
2.1. Intérêt de l'utilisation de l'anticorps anti-PARP clivé	94
2.2. Prédominance de l'activation de la caspase-3 dans les tumeurs HT29 traitées par Foscan®-PDT	95
SYNTHESE GENERALE DES RESULTATS	120
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	125
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	127
ANNEXE.....	148

INTRODUCTION GENERALE

La thérapie photodynamique (PDT) est une modalité de traitement des petites tumeurs localisées accessibles à la lumière. Son principe repose sur l'activation par la lumière d'une molécule (photosensibilisateur) localisée au niveau du site tumoral. Le photosensibilisateur, non toxique à l'obscurité, est excité sous l'effet de l'irradiation lumineuse et va générer, en présence d'oxygène, des réactions photochimiques conduisant à l'apparition d'espèces réactives de l'oxygène très cytotoxiques. L'une des espèces majoritaires est l'oxygène singulet, produit à partir de l'oxygène moléculaire présent dans les tissus.

La mort des cellules tumorales induite par ce traitement résulte de la combinaison de dommages cytotoxiques directs sur les cellules tumorales, de l'altération du système vasculaire de la tumeur aboutissant à l'arrêt du flux sanguin et d'effets sur le système immunitaire liés à une réponse inflammatoire importante. L'entrée en hypoxie de la tumeur pendant l'irradiation est un facteur limitant de l'efficacité de la thérapie photodynamique. Le maintien de l'oxygénation favorise les processus de mort cellulaire programmée de type apoptose et minore les réactions inflammatoires. L'apoptose photoinduite, souvent montrée comme modalité de mort cellulaire majoritaire *in vitro*, dépend fortement de la localisation intracellulaire du photosensibilisateur. L'identification des dommages moléculaires photoinduits, impliqués dans l'induction et le contrôle du processus apoptotique contribue à élaborer une stratégie proapoptotique du traitement.

Le Foscan® (meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin, m-THPC, Temoporfin) est un photosensibilisateur de seconde génération, reconnu comme l'un des plus efficaces à ce jour. Cependant, les propriétés photophysiques du Foscan® ne peuvent pas à elles seules expliquer son efficacité et certains mécanismes d'action restent à élucider. Les protocoles cliniques actuels favorisent l'accumulation du Foscan® dans les cellules tumorales et produisent après PDT une réponse inflammatoire importante et une efficacité thérapeutique perfectible. L'apoptose photoinduite par le Foscan® a été mise en évidence *in vitro* cependant les aspects moléculaires du processus apoptotique restent peu connus.

Les travaux entrepris dans le cadre de cette thèse ont pour but d'approfondir les connaissances actuelles sur l'apoptose induite par la PDT avec le Foscan® afin de mieux cerner les possibilités d'orienter le traitement vers ce mécanisme de mort cellulaire programmée. Nous avons tout d'abord mis en évidence l'implication de la voie mitochondriale dans la réponse apoptotique puis nous avons montré, en utilisant le sphéroïde comme modèle, une modulation de l'apoptose par l'irradiance. Par la suite, nous avons montré que l'allongement du temps de contact des cellules avec le Foscan® favorisait sa localisation dans le réticulum endoplasmique ce qui modifiait l'expression de certains événements moléculaires et favorisait l'apoptose photoinduite par le Foscan® . Enfin, la recherche de marqueurs de l'apoptose induite *in vivo*, applicables en immunohistochimie sur coupes tissulaires, montre l'intérêt d'utiliser différents anticorps pouvant différencier les événements moléculaires liés à l'exécution de l'apoptose caspase-dépendante.

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

1. LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE

1.1. Historique

L'utilisation thérapeutique de la lumière seule ou en présence de composés chimiques comme les psoralènes remonte à la plus haute antiquité comme le révèlent certains traitements qui étaient appliqués en Inde, Chine ou Egypte pour des cas de vitiligo, psoriasis, cancers cutanés ou même de pathologie générale comme les psychoses. Cependant ce n'est qu'au XX^{ième} siècle qu'est apparu le concept de « thérapie photodynamique » basé sur les effets cytotoxiques d'une molécule photoactivable en présence d'oxygène. La première étude relatant la toxicité d'un colorant (acridine) et ses dérivés en présence de lumière sur des paramécies fut publiée par Oscar Raab en 1900 (1). Elle fut suivie, en 1902, par la mise en évidence du rôle majeur de l'oxygène dans ce processus toxique (2). Von Tappeiner fut le premier à employer les termes « réactions photodynamiques » (3) et à pratiquer les premiers essais cliniques chez des patients souffrant de lésions cutanées syphilitiques ou tuberculeuses (4).

En 1911, les propriétés photoactives de l'hématoporphyrine, un dérivé de l'hème, furent publiées (5). Appliqué sur de petites lésions cutanées dues au psoriasis, ce composé se révéla efficace en association avec une irradiation UV (6). L'accumulation et la rétention spécifiques de l'hématoporphyrine dans les tumeurs (7) permit à Figge et al (8) de proposer l'hématoporphyrine comme photosensibilisateur pour la thérapie photodynamique. L'hématoporphyrine, mélange complexe de porphyrines et d'impuretés, fut purifiée en 1955 (9) pour donner naissance à l'hématoporphyrine dérivée (HpD) (10). Celle-ci fut appliquée chez l'homme pour améliorer les méthodes de diagnostic, en particulier endoscopiques (11; 12).

La thérapie photodynamique a connu un essor dans les années 70 grâce aux expérimentations de Thomas Dougherty qui démontra le bénéfice à long terme du traitement photodynamique avec l'HpD (13). L'HpD a donné naissance à de nombreux dérivés dont le plus utilisé en clinique est le Photofrin®. Ce photosensibilisateur a été

approuvé pour le traitement du papillome de la vessie au Canada en 1993. Son utilisation s'est répandue aux Etats-Unis, en Europe et au Japon pour certaines indications de tumeurs des voies aérodigestives supérieures (14). Actuellement, les porphyrines et les composés dérivés des porphyrines forment encore le noyau dur des photosensibilisateurs utilisés en clinique.

La recherche s'oriente vers l'élaboration de nouveaux photosensibilisateurs, sur la compréhension des propriétés optiques des tissus et sur l'optimisation des protocoles d'application de la thérapie photodynamique. Ce dernier point met l'accent sur l'importance de la dosimétrie et la nécessité d'ajuster l'ensemble des paramètres (dose de photosensibilisateur, de lumière, sélectivité tissulaire, photosensibilisation cutanée) pour une meilleure efficacité. Dans cette optique, la compréhension des facteurs cellulaires et tissulaires, qui contrôlent la réponse biologique au traitement, est une composante essentielle de la stratégie visant à développer les applications cliniques de la thérapie photodynamique.

1.2. Les réactions photochimiques

La photosensibilisation peut être définie comme un processus au cours duquel l'activation par la lumière d'un chromophore (le photosensibilisateur) va modifier chimiquement une molécule différente (le substrat). Idéalement, le photosensibilisateur devrait jouer un rôle de catalyseur : il devrait se régénérer suite à son interaction avec le substrat et ne devrait pas interférer avec l'issue de la réaction. En photobiologie et en photomédecine, la terminologie « action photodynamique » est réservée aux réactions de photosensibilisation consommant de l'oxygène moléculaire (3). Les mécanismes de photosensibilisations sont initiés par l'absorption de lumière ($h\nu$) par un photosensibilisateur (P), qui, sous l'effet de cette irradiation, passe à un état excité (P^*). En présence d'oxygène, deux réactions dites de type I et II, faisant intervenir le photosensibilisateur à l'état excité, entrent en compétition. Selon la définition établie par Foote (15), le mécanisme de type I implique l'interaction directe du photosensibilisateur à l'état excité avec le substrat (S) alors que, dans un processus de type II, le photosensibilisateur à l'état excité réagit d'abord avec l'oxygène moléculaire pour former des espèces réactives de l'oxygène susceptibles d'initier d'autres réactions (Figure 1).

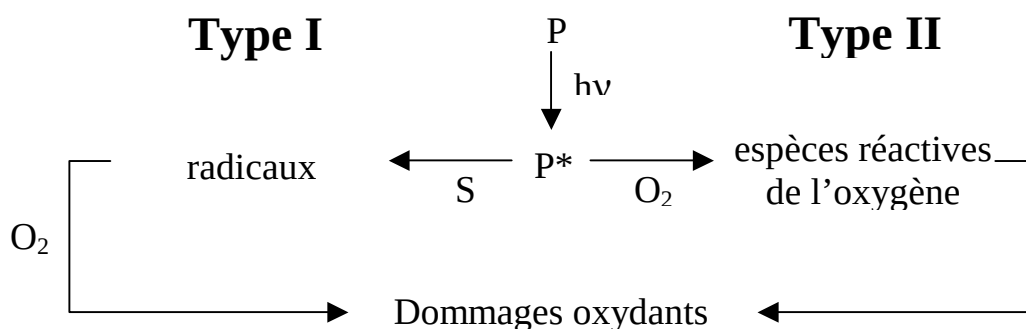
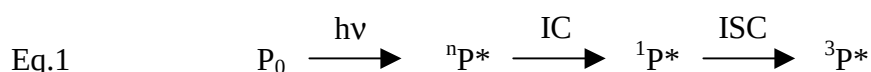


Figure 1 : Les réactions photochimiques de type I et II faisant intervenir le photosensibilisateur à l'état triplet suite à son activation par la lumière

Sous l'effet de l'irradiation lumineuse ($h\nu$), le photosensibilisateur passe d'un état fondamental P_0 à un état singulet excité ($^n P^*$) de durée de vie courte qui va être stabilisé par conversion interne (IC) à un niveau d'excitation singulet de plus faible énergie $^1 P^*$. Peu de réactions peuvent avoir lieu à partir de cet état électronique de la molécule en raison de sa faible durée de vie (10^{-9} s). Le plus souvent, $^1 P^*$ rejoint un état triplet de plus faible énergie ($^3 P^*$) par transition intersystème (ISC). Cette réaction est donnée par l'équation 1.

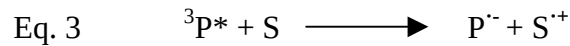
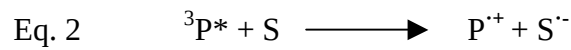


Dans son état triplet de durée de vie plus longue (10^{-6} à 1s en fonction de son environnement), le photosensibilisateur est un agent très réactif qui va intervenir dans les réactions photochimiques de type I et II. Un rendement quantique en état triplet élevé ainsi qu'un état triplet de longue durée de vie constituent donc des pré-requis pour une photosensibilisation efficace (16).

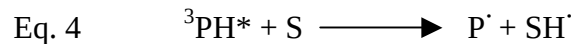
1.2.1. Les réactions photochimiques de type I

Les réactions photochimiques de type I se traduisent par la production de radicaux libres ou d'ions radicalaires suite au transfert d'électron ou d'hydrogène entre le photosensibilisateur à l'état triplet et le substrat S . Le transfert d'électron peut

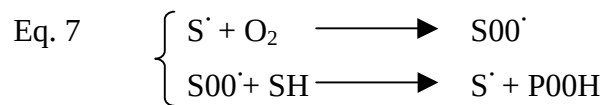
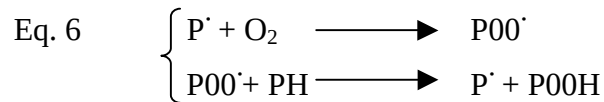
s'effectuer du photosensibilisateur vers le substrat (Equation 2) ou du substrat vers le photosensibilisateur (Equation 3). Cependant, la plupart des substrats biologiques subissent une oxydation (Equation 3).



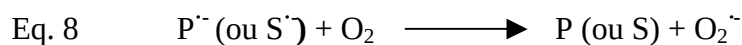
De la même manière, aussi bien le photosensibilisateur à l'état triplet (Equation 4) que le substrat (Equation 5) peut jouer le rôle de donneur d'hydrogène.



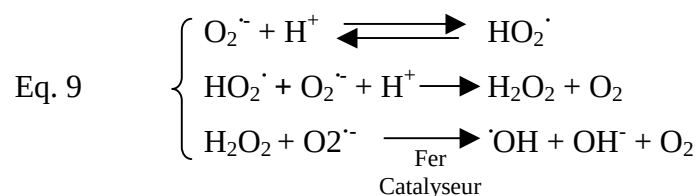
Les espèces radicalaires générées au cours des réactions de type I peuvent intervenir dans d'autres réactions. Les formes oxydées du photosensibilisateur (Equation 6) ou du substrat (Equation 7) peuvent par exemple rapidement réagir avec l'oxygène moléculaire (O_2) présent pour former des radicaux peroxydes, initiant ainsi une chaîne d'auto-oxydation.



Les formes semi-réduites du photosensibilisateur ou du substrat peuvent également interagir de manière efficace avec l'oxygène. Dans ce cas, le transfert d'électron qui a lieu entre les deux réactifs entraîne la formation de l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Equation 8).



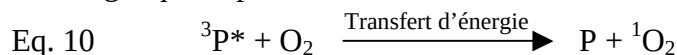
Une fois formé, l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$ peut réagir directement avec différents substrats ou agir comme précurseur d'autres espèces réactives de l'oxygène (Equation 9). Il intervient notamment dans la formation du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et du radical hydroxyle $\cdot\text{OH}$. En conditions physiologiques, H_2O_2 est produit par dismutation de $\text{O}_2^{\cdot-}$ dont le principe repose sur la protonation de $\text{O}_2^{\cdot-}$ pour former son acide conjugué $\text{HO}_2^{\cdot}$, suivie par la réaction de $\text{HO}_2^{\cdot}$ avec $\text{O}_2^{\cdot-}$. Le radical hydroxyle peut être alors produit au cours de la réaction de Fenton entre le peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et l'anion superoxyde $\text{O}_2^{\cdot-}$.



Les réactions photochimiques de type I peuvent donc produire plusieurs espèces réactives intermédiaires. Même si l'oxygène n'est pas impliqué dans la première étape du mécanisme, sa présence dans l'environnement influence fortement les réactions chimiques qui induisent la formation d'espèces réactives de l'oxygène comme le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂), l'anion superoxyde (O₂^{•-}) et le radical hydroxyle (•OH). Ces espèces sont de puissants oxydants pour une grande variété de biomolécules comme le cholestérol ou les chaînes latérales de certains acides aminés (tryptophane, histidine et méthionine) (17).

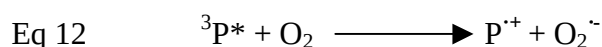
1.2.2. Les réactions photochimiques de type II

Dans les réactions photochimiques de type II, la présence d'oxygène est requise dès la première étape du processus. Dans ce cas, un transfert d'énergie s'effectue depuis le photosensibilisateur à l'état triplet vers l'oxygène moléculaire. Le processus (Equation 10) permet la régénération du photosensibilisateur dans son état fondamental et conduit à la formation d'oxygène singulet (¹O₂ ou O₂¹(Δ_g)) qui correspond à l'état énergétique le plus faible.



L'oxygène diffère de la plupart des molécules organiques par sa multiplicité triple à l'état fondamental. La réaction 10 n'est possible que si l'énergie de l'état triplet du photosensibilisateur est supérieure à l'énergie de l'oxygène singulet E_Δ. Comme cette énergie est relativement faible (94,5 kJ/mole) (18), un grand nombre de molécules sont susceptibles d'intervenir dans la génération d'oxygène singulet ¹O₂ par un transfert d'énergie d'état triplet à état triplet.

Un mécanisme alternatif d'interaction entre l'état triplet excité du photosensibilisateur et l'oxygène moléculaire implique directement un transfert d'électrons. Cette réaction (Equation 12) entraîne la production de l'anion superoxyde et de la forme radicalaire cationique du photosensibilisateur mais reste cependant minoritaire en PDT.



Dans le cas d'une réaction de type II classique, le rendement quantique de production d'oxygène singulet par un photosensibilisateur peut être déterminé à partir de la Figure 2 (19). Le schéma résume les cinétiques de désactivations et réactions

possibles impliquant le photosensibilisateur à l'état triplet : émission de phosphorescence, relaxation non radiative et interactions avec l'oxygène par désactivation physique ou par transfert d'énergie, ce dernier mécanisme conduisant à la formation d'oxygène singulet.

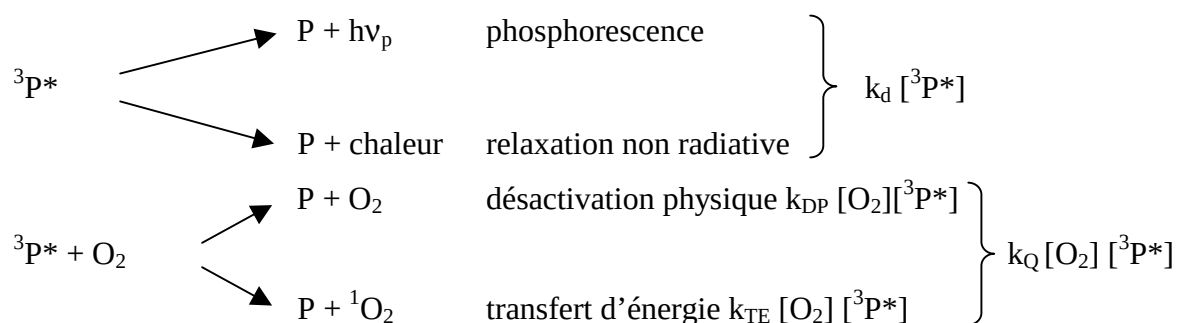


Figure 2: Processus physiques et chimiques impliquant le photosensibilisateur à l'état triplet excité $^3P^*$, avec leurs constantes respectives : k_d constante de désactivation de $^3P^*$, k_{DP} constante de désactivation physique, k_{TE} constante de transfert d'énergie, k_Q constante d'interaction de $^3P^*$ avec O_2 , $k_Q = k_{DP} + k_{TE}$.

Le calcul du rendement quantique en oxygène singulet (Φ_Δ) est alors donné par l'équation 11

$$\text{Eq.11 } \Phi_\Delta = \Phi_{ISC} F_Q S_\Delta \quad \text{où :}$$

Φ_{ISC} = rendement quantique de production de photosensibilisateur à l'état triplet

F_Q = probabilité de désactivation de l'état triplet excité par réaction avec l'oxygène, $F_Q = k_Q [O_2] / k_d + k_Q [O_2]$

S_Δ = probabilité que la réaction entre le photosensibilisateur à l'état triplet et l'oxygène induise la formation d' $^1O_2$, $S_\Delta = k_{TE} / k_{DP} + k_{TE}$

Dans le cas particulier où $k_d < k_Q [O_2]$, $\Phi_\Delta = \Phi_{ISC} S_\Delta$, est la forme de l'équation 11 la plus utilisée.

Le rendement quantique de production d'oxygène singulet du photosensibilisateur est un paramètre d'importance en PDT. Ce paramètre a déjà été reporté pour plus d'une centaine de molécules d'intérêt en biologie (20).

1.3. Mécanismes liés à l'oxygène

1.3.1 Réactions d'oxydation générées par l'oxygène singulet en milieu cellulaire

La cellule contient nombre de biomolécules potentiellement oxydables par l'^1O_2 . Les acides aminés en particulier cystéine, tyrosine et tryptophane sont les plus sensibles à l'oxydation ce qui place la classe abondante des protéines comme première cible de l'^1O_2 . Les lipides insaturés comme les acides gras poly-insaturés constituent également des substrats primordiaux pour l'^1O_2 généré dans les structures membranaires. La réaction d'oxydation des molécules biologiques par l'^1O_2 est très rapide. Le temps de demi-vie de l'^1O_2 est donc court, 4 μs dans l'eau et probablement inférieur à cette valeur dans la cellule (21). Par conséquent, la distance de diffusion de l'oxygène singulet est également limitée, comprise entre 0,01 et 0,045 μm dans le milieu cellulaire (22) et estimée plus précisément à environ 220 nm pendant 3 demi-vies (5% l'^1O_2 restant dans la cellule) (21). Ces caractéristiques impliquent que les premières réactions d'oxydation dues à l'^1O_2 se réalisent dans un volume extrêmement faible par rapport au volume cellulaire. De plus cette localisation est précise puisque le site de formation de l'^1O_2 est déterminée par le site intracellulaire de localisation du photosensibilisateur. C'est pourquoi s'est imposée la notion de « réponse cellulaire à l'^1O_2 résolue dans l'espace », définie comme une réponse spécifique de la cellule suite à la génération et à la réaction de l'^1O_2 située dans un espace subcellulaire précis. Cet espace subcellulaire, dans lequel se situe sélectivement le photosensibilisateur, peut être la totalité ou partie d'un organite, une structure (membrane, microtubules) ou le proche environnement d'une protéine cible. La réponse cellulaire signifie le changement de comportement de la cellule, suite à ces premières réactions de photo-oxydation, qui engagent plusieurs molécules à distance de l'endroit où l'^1O_2 est formé. Par exemple, dans le cas de l'apoptose, un photosensibilisateur localisé dans la mitochondrie va produire, après PDT, une réponse mitochondriale de type libération du cytochrome c dans le cytoplasme où il sera à l'origine de l'activation des caspases. Par conséquent, le site initial de réaction est spécifique (la mitochondrie) pour une réponse donnée (libération du cytochrome c) mais cette réponse est exécutée à distance dans la cellule (le cytoplasme). Cet effet peut même être étendu aux autres cellules par effet de proximité (« bystander effect ») (21).

Bien que les réactions photodynamiques dans les tissus biologiques soient étiquetées le plus souvent Type 1 (radicaux) ou Type II ($^1\text{O}_2$), il est utile de préciser que cette terminologie ne s'applique qu'aux réactions primaires qui découlent de l'excitation du photosensibilisateur. En effet, les radicaux peuvent également se former après une réaction de Type II et induire une réponse cellulaire. L' $^1\text{O}_2$ en réagissant avec les protéines ou les lipides insaturés produit des hydroperoxides qui sont des espèces réactives de l'oxygène, secondaires par rapport à celles qui peuvent être formées par réaction de Type I. Ces espèces réactives de l'oxygène secondaires peuvent être converties en espèces radicalaires qui ont une durée de vie plus longue, peuvent diffuser à distance dans la cellule et produire des dommages oxydants majeurs. Ainsi, des dommages de l'ADN peuvent être induits après peroxydation par l' $^1\text{O}_2$ des lipides insaturés de la membrane, et la peroxydation des protéines par l' $^1\text{O}_2$ peut conduire à l'inactivation de certaines enzymes (21).

1.3.2. La photodégradation des photosensibilisateurs

La plupart des photosensibilisateurs utilisés en thérapie photodynamique, tels que les porphyrines et leurs dérivés, subissent une dégradation progressive au cours de l'irradiation, appelée photoblanchiment, qui se traduit par une diminution de leur capacité à absorber la lumière (23). Le photoblanchiment met en jeu deux mécanismes (24) :

- La photodégradation (« true photobleaching ») qui correspond à une modification profonde de la structure du photosensibilisateur qui se fragmente, conduisant à la formation de plusieurs photoproduits n'absorbant pas ou peu la lumière visible,
- La phototransformation (« photomodification ») qui correspond à une perte de l'absorbance ou de la fluorescence du photosensibilisateur à certaines longueurs d'onde mais le chromophore est conservé.

Dans la plupart des cas, les processus de photoblanchiment en PDT correspondent à une oxydation du photosensibilisateur à l'état fondamental. La dégradation du photosensibilisateur peut être induite par des espèces réactives de l'oxygène autres que l'oxygène singulet, comme le peroxyde d'hydrogène ou l'anion

superoxide, produites au cours de l'irradiation. Cependant, l'oxygène singulet joue un rôle prépondérant dans le photoblanchiment des porphyrines (25) et des chlorines (26).

Les doses de lumière conventionnellement appliquées en PDT entraînent le photoblanchiment du photosensibilisateur présent à la surface de la tumeur ou dans les zones proches de la source lumineuse. Ce phénomène présente l'inconvénient majeur de diminuer la concentration de photosensibilisateur dans les tissus irradiés. De plus, l'obtention d'un effet maximal de la PDT sur la tumeur doit tenir compte des tissus sains environnants. Une faible dose de photosensibilisateurs associée à une forte dose de lumière est une solution pour obtenir la nécrose tumorale avec des dommages limités dans les tissus sains. En effet, ces conditions permettent le photoblanchiment de la faible quantité de photosensibilisateur localisé dans les tissus sains alors que le tissu tumoral qui contient 2 à 10 fois plus de photosensibilisateur peut être simultanément détruit (27). La diminution de la concentration du photosensibilisateur par photoblanchiment s'accompagne d'une diminution de la consommation photochimique en oxygène au cours de l'irradiation (25).

La phototransformation présente l'avantage d'induire la formation de photoproduits pouvant eux même servir de photosensibilisateurs (28).

Le photoblanchiment est un paramètre essentiel dans les études de dosimétrie. La dosimétrie « explicite » qui prend en compte tous les paramètres de dose est extrêmement complexe. Aussi, la dosimétrie « implicite » basée sur une variable qui incorpore de manière implicite quelques uns ou de préférence tous les paramètres de dose permet de s'affranchir de leur mesure directe. Dans ce concept, la mesure du photoblanchiment est intéressante car si les dommages biologiques et le photoblanchiment impliquent des processus faisant intervenir la même espèce réactive de l'oxygène (principalement l' $^1\text{O}_2$), la mesure du photoblanchiment peut devenir un outil d'évaluation des dommages biologiques (29; 30 ; 31).

1.3.3. La consommation en oxygène au cours de la PDT

L'efficacité de la thérapie photodynamique dépend de manière critique de la présence d'oxygène (32). Sa disponibilité peut-être intrinsèquement compromise dans les cellules tumorales localisées au delà de la limite de diffusion de l'oxygène à partir

des vaisseaux ou dans les zones localisées autour des vaisseaux soumis à des changements transitoires de perfusion (33).

L'hypoxie secondaire aux dommages vasculaires photoinduits est un mécanisme bien connu qui favorise la réponse au traitement. Cependant, les conséquences des dommages vasculaires et de l'hypoxie pendant la PDT sont moins évidentes. La production des espèces réactives de l'oxygène produites par les réactions photochimiques est associée à la consommation de l'oxygène moléculaire. Ce processus, nommé consommation photochimique de l'oxygène est un autre mécanisme par lequel la PDT crée l'hypoxie pendant le traitement. Agissant indépendamment ou en synergie, les dommages vasculaires et la consommation photochimique de l'oxygène peuvent produire, pendant l'irradiation, une hypoxie préjudiciable à l'effet thérapeutique de la PDT. Les conséquences biologiques de la consommation en oxygène due à la réaction photochimique ont été estimées grâce à des modèles mathématiques basés sur la distribution radiale de l'oxygène par rapport à la distance du capillaire. Ces modèles prédictifs montrent que la PDT peut créer une déplétion sévère en oxygène qui dépend de cette distance (34; 35). Le processus de consommation photochimique de l'oxygène a été démontré expérimentalement dans les sphéroïdes. Ce modèle de micro-tumeur non vascularisé a également permis de montrer la possibilité de moduler la déplétion en oxygène par le choix de l'irradiance (puissance de la lumière rapportée à l'unité de surface) (36; 37). D'après la simulation mathématique proposée par Foster et al (35), une irradiance élevée produit dans un tissu une consommation d'oxygène moléculaire pendant l'irradiation supérieure à la réoxygénation due à l'oxygène diffusé à partir des vaisseaux sanguins. Cette hypothèse a été validée *in vivo* en particulier par les travaux de Sitnik (38) qui montre les effets de l'irradiance sur la consommation photochimique de l'oxygène et ses répercussions sur la réponse des tumeurs traitées par Photofrin®-PDT. L'augmentation de la consommation en oxygène en fonction de l'irradiance a été évaluée par la mesure de la pression partielle en oxygène (pO_2). A irradiance élevée (150 mW/cm^2), une diminution rapide de la pO_2 intratumorale est observée tout au long du traitement tandis qu'à faible irradiance (30 mW/cm^2) la pO_2 est maintenue (38). La préservation de l'oxygénation pendant le traitement à faible irradiance a été confirmée dans un autre modèle tumoral traité par Foscan®-PDT (39). Dans les deux études, la réponse tumorale après PDT est inversement corrélée à l'irradiance.

D'autres méthodes pour moduler la concentration en oxygène de la tumeur pendant l'irradiation ont été étudiées. L'hyper-fractionnement de l'irradiation faisant succéder de brèves périodes d'obscurité et de lumière facilite la réoxygénation entre les intervalles de lumière. Par ce procédé, il a été possible d'améliorer la réponse à long terme de tumeurs soumises à la PDT utilisant divers photosensibilisateurs (40; 41).

Cependant, l'application de faibles irradiances ou le fractionnement de l'irradiation présentent l'inconvénient de ne compenser que la déplétion en oxygène induite pendant l'irradiation. L'inhalation continue, par les souris, de carbogène (95% O₂ + 5% CO₂) de préférence combiné à l'injection de nicotamide pour éviter les phénomènes de vasoconstriction, produit une amélioration sensible de l'efficacité du traitement par Foscan®-PDT (42). De même, Huang et al (43) montrent que l'inhalation d'oxygène normobarique ou hyperbarique produit une meilleure réponse à la PDT avec le Photofrin® et observent une augmentation de la pO₂ pendant l'irradiation (43).

Enfin, pour certains photosensibilisateurs, le choix de l'intervalle drogue-lumière (IDL) peut affecter l'oxygénation du tissu pendant l'irradiation. Par exemple, un intervalle court diminue l'oxygénation pendant la PDT utilisant la Verteporfin® par diminution de la perfusion pendant l'illumination. Par contre, un long IDL facilite une élévation de la pO₂. Celle-ci pourrait être due à un flux sanguin augmenté par l'effet chaleur ou la réponse physiologique à la déplétion en oxygène (44) et/ou à une consommation métabolique plus faible en raison de la destruction des cellules tumorales au cours de l'irradiation (45). L'évolution du flux sanguin pendant et après la PDT semble être un paramètre important pour prédire la réponse au traitement. En effet, une diminution rapide du flux sanguin pendant l'irradiation est corrélée avec un délai plus court de la reprise de la croissance tumorale après traitement alors qu'une diminution lente du flux sanguin pendant l'irradiation correspond à une meilleure réponse au traitement (46).

La déplétion en oxygène a fait l'objet d'études plus précises grâce à la mise en évidence de la répartition spatiale de l'hypoxie dans la tumeur pendant la PDT (47). L'étude de Busch et al montre que, à irradiance élevée (75 mW/cm²), l'hypoxie périvasculaire se développe pendant le traitement alors qu'à irradiance faible (38 mW/cm²) une meilleure oxygénation des tissus adjacents aux vaisseaux sanguins est maintenue (47). Ultérieurement, Wang et al (48) ont étudié l'oxygénation des tumeurs par la mesure de la saturation en oxygène de l'hémoglobine (SO₂) avant et après PDT par spectroscopie en réflectance diffuse. Ils ont montré la valeur prédictive de la

modification relative de la SO_2 (SO_2 après PDT/ SO_2 avant PDT), la durée de rémission après PDT étant significativement corrélée avec l'augmentation de la SO_2 relative. Les auteurs suggèrent que l'utilisation de procédés non invasifs comme la spectroscopie en réflectance diffuse pour mesurer la consommation en oxygène pendant l'irradiation pourrait permettre de suivre la progression du traitement (48). Dans ce contexte, le suivi du taux d'oxyhémoglobine (HbO_2) pendant l'irradiation pourrait être une donnée intéressante (46).

La consommation de l'oxygène moléculaire est également liée à la formation des espèces réactives de l'oxygène en particulier de l'oxygène singulet. La mesure, par luminescence, de la production d' $^1O_2$ dans la peau de souris pendant la PDT montre une forte corrélation entre la dose cumulative d' $^1O_2$ formé et la réponse au traitement (49). Cependant, la détection directe de l'oxygène singulet par luminescence est techniquement très difficile et peu envisageable en clinique. Les modèles de dosimétrie implicite, intégrant la théorie du photoblanchiment dû à la formation de l' $^1O_2$, ont permis de calculer une dose seuil d' $^1O_2$ réactif dans un système de sphéroïdes traités par PDT avec Photofrin® (25) ou Foscan® (30) (respectivement $12,1 \pm 1,2$ mM et $7,9 \pm 2,2$ mM). Dysart et al (31; 50), en photosensibilisant des cellules avec les mêmes composés ont établi le temps de vie de l' $^1O_2$ dans une cellule ($0,048 \pm 0,005$ μ s pour le Photofrin® et 0,05 à 0,25 μ s pour le Foscan®) ainsi que le nombre de molécules d' $^1O_2$ nécessaire pour réduire la survie cellulaire d'un module de log (2×10^8 molécules pour le Photofrin® et 9×10^8 pour le Foscan®) (31; 50).

1.3.4. Modulation des mécanismes de la PDT par l'irradiance

La déplétion photochimique en oxygène dépendante de l'irradiance est observée avec tous les photosensibilisateurs et cet effet modifie la réponse à la PDT de nombreux modèles tumoraux précliniques (51). Les effets de l'irradiance dépendent fortement de la quantité du photosensibilisateur dans la tumeur et également des propriétés photophysiques de ce dernier (52). Néanmoins, les faibles irradiances sont corrélées à un meilleur effet thérapeutique, elles correspondent à une apoptose plus généralisée dans le tissu tumoral ainsi qu'à une réponse inflammatoire plus homogène. A irradiances élevées, cellules apoptotiques et cellules hôtes inflammatoires (neutrophiles, macrophages) restent confinées à proximité des vaisseaux (53).

Cependant des facteurs limitant existent. En effet, en dessous d'un certain seuil (environ 5 mW/cm²) la PDT est moins efficace ce qui suggère des dommages photoinduits sublétaux pouvant être réparés par la cellule (51) mais aussi la possibilité d'une diminution de la perméabilité vasculaire qui est minimale à irradiance élevée mais également aux irradiances très faibles (< 20 mW/cm²) (54). De plus, une diminution de l'irradiance s'accompagne nécessairement d'une augmentation de la dose de lumière (fluence) pour obtenir la cure tumorale (Figure 3). Cette augmentation doit tenir compte des dommages produits au niveau des tissus sains et, de ce fait, la fluence doit être ajustée de façon à les éviter (55).

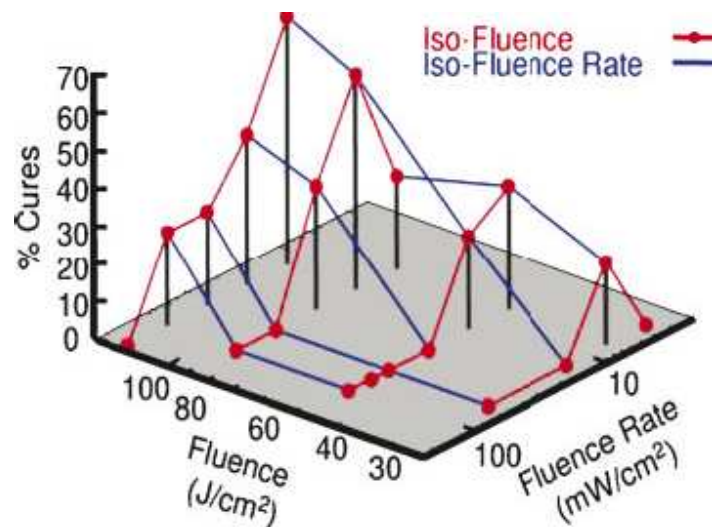


Figure 3 : Réponse tumorale de tumeurs colo-26 traitées par HPPH-PDT en fonction de l'irradiance (0 à 224 mW/cm²) et de la fluence (0 à 128 J/cm²). D'après Henderson et al (51)

En situation clinique, l'influence de l'irradiance sur la réponse à l'ALA-PDT de kératoses actiniques a été montrée par Ericson et al (56). Les auteurs concluent qu'une irradiance faible (30 mW/cm²) apporte plus de bénéfice thérapeutique qu'une irradiance plus élevée (75 mW/cm²) (56). Cependant il demeure beaucoup d'incertitudes quant au rôle de l'irradiance sur l'efficacité de la PDT en clinique. D'autres paramètres (revue de Henderson et al (51)) peuvent jouer sur l'efficacité du traitement comme la concentration de photosensibilisateur dans la tumeur qui peut être très différente d'un type de tumeur à l'autre, la distance de la source lumineuse, l'état d'oxygénation des tissus qui influence la pénétration de la lumière entre 580-800 nm due à l'absorption de l'hémoglobine, l'état de la micro-vascularisation de la tumeur qui peut être irrégulière et altérée et les hypoxies préexistantes. Enfin, le facteur temps est à

considérer car la durée d'un traitement à faible irradiance n'est pas entièrement compensée par le gain d'efficacité dû à la diminution de la dose de lumière. En clinique, le choix de l'irradiance est conditionné par la nécessité d'appliquer un traitement PDT dans une limite de temps raisonnable (51). Une alternative pourrait être une application métronomique de la PDT grâce à une distribution lente et continue de photosensibilisateur et de lumière, celle-ci étant délivrée par une source de lumière implantée de type LED (57).

1.4. Les mécanismes de photodestruction des tumeurs par la PDT

La destruction tumorale par la thérapie photodynamique résulte de l'action combinée de deux mécanismes :

Un effet *direct* létal de la PDT sur les cellules tumorales,

Un effet *indirect* de la PDT sur la vascularisation tumorale qui se manifeste par i) une altération de l'oxygénation des tumeurs, ii) l'induction d'une réponse immunitaire et inflammatoire.

Ces effets cellulaires, vasculaires et immunitaires s'influencent mutuellement produisant une multitude de réponses possibles. Leur combinaison est requise pour contrôler les tumeurs à long terme, mais leur contribution respective dans la réponse globale n'est pas encore clairement établie (58).

1.4.1. Dommages cellulaires

L'effet cytotoxique direct de la PDT est la résultante de l'incorporation préférentielle des photosensibilisateurs dans les membranes cellulaires et la génération, après illumination, d'espèces réactives de l'oxygène générant des dommages irréversibles. La localisation subcellulaire des photosensibilisateurs est un facteur déterminant dans l'induction de l'apoptose après irradiation du fait des dommages moléculaires initiaux produits essentiellement par l'oxygène singulet extrêmement actif mais dont le rayon de diffusion et la durée de vie sont limités (21; 22). La mitochondrie a été montrée comme une des premières cibles de l'oxygène singulet (59) et de ce fait l'apoptose est l'un des mécanismes de mort cellulaire les plus étudiés *in vitro*. D'autres modalités de mort cellulaire, nécrose, autophagie sont également décrites. L'ensemble

de ces mécanismes sont explicités dans la troisième partie de cette thèse avec une attention toute particulière pour l'apoptose qui est le fil conducteur des travaux menés dans le cadre de cette thèse.

1.4.2. Dommages vasculaires

Le flux sanguin est le moyen d'apporter aux tissus et aux tumeurs l'oxygène et les nutriments indispensables à leur survie. La PDT peut induire une altération du système vasculaire qui alimente la tumeur, la privant ainsi d'oxygène et de nutriments. Les dommages vasculaires peuvent ainsi induire directement la mort des cellules par ischémie.

Les dommages vasculaires mettent en jeu plusieurs mécanismes complexes qui s'influencent mutuellement. La stase vasculaire peut être liée à une vasoconstriction ou à une agrégation plaquettaire. L'altération des cellules endothéliales et des protéines du cytosquelette dans ces cellules ainsi qu'une perméabilité immédiate des vaisseaux sont également impliquées. Ces phénomènes conduisent à la libération de molécules vasoactives, à l'occlusion vasculaire et à la réduction du flux sanguin (revue dans Fingar et al (60)).

1.4.3. Réponse immunitaire

L'importance de la réaction immunitaire a été mise en évidence en comparant l'efficacité de la PDT avec le Photofrin® sur tumeurs greffées soit chez des souris immunocompétentes soit chez des souris SCID (déficientes en lymphocytes T et B). Korbelik et al (61) ont ainsi montré que, bien que la réponse au traitement à court terme ait été équivalente, la rémission à long terme après PDT était considérablement réduite chez les souris SCID, ce qui suggère que certaines cellules tumorales ayant échappé à l'effet direct de la PDT peuvent être détruites par réaction immunitaire spécifique (61). Plusieurs travaux ont montré l'activation des macrophages, neutrophiles et cellules T et la production de cytokines comme IL-6, IL-10 et TNF-alpha mais il semble très difficile d'en apprécier l'impact sur la réponse thérapeutique. Henderson et al (53) ont observé qu'en faisant varier l'irradiance et la fluence de la PDT, une meilleure cure tumorale

était obtenue pour des conditions de traitement induisant une réponse inflammatoire minimale (faible irradiance, 14 mW/cm²). Cependant, lorsque l'irradiance est élevée, les animaux chez lesquels il y a déplétion de neutrophiles répondent moins bien à la PDT que les animaux normaux. Les auteurs concluent que l'inflammation locale n'est pas un facteur critique de la réponse à la PDT lorsque celle-ci est appliquée dans des conditions optimales (53).

1.5. Les photosensibilisateurs

1.5.1. Propriétés idéales d'un photosensibilisateur

L'HpD et ses dérivés comme le Photofrin® font partie des photosensibilisateurs de première génération. Leurs inconvénients, faible sélectivité, clairance lente induisant une photosensibilisation cutanée de plusieurs semaines, faible absorption dans le rouge ne permettant pas de traiter les tumeurs profondes, complexité de leur composition, ont permis de définir dans les années 80 les propriétés d'un bon photosensibilisateur (62):

- Toxicité du photosensibilisateur à l'obscurité nulle ou faible,
- Bonne sélectivité tumorale, clairance rapide de façon à limiter la photosensibilisation des tissus sains,
- Composition constante, de préférence pure et facile à synthétiser,
- Rendement quantique en état triplet élevé,
- Absorption dans la région rouge du spectre de la lumière visible permettant d'augmenter la profondeur d'irradiation.

1.5.2. Les photosensibilisateurs de deuxième et de troisième génération

Différentes modifications chimiques apportées à la structure tetrapyrrolique des porphyrines ont permis de définir une nouvelle classe de photosensibilisateurs dite de seconde génération (63). Les améliorations apportées par rapport à l'HpD et au Photofrin® sont une pureté leur conférant une stabilité accrue, une faible toxicité en

absence de lumière, une longueur d'onde d'absorption dans la zone rouge du spectre ainsi qu'un bon rendement quantique en oxygène singulet (64).

La plupart des photosensibilisateurs actuellement en cours d'étude appartiennent à deux classes chimiques : les cyanines et les chlorines. Parmi les cyanines, les phthalocyanines et les naphthalocyanines qui possèdent la présence d'ions tels que l'aluminium, le zinc (II), le cuivre ou le silicone (IV) présentent un bon rendement quantique d'oxygène singulet. Ainsi, la phthalocyanine siliconée (Pc 4) est actuellement en essai clinique de phase I pour les lymphomes cutanés (65). Les phthalocyanines avec zinc (ZnPcs), cuivre (CuPcs) et chlorure d'aluminium (ClAlPcs) sont en cours d'étude pour le traitement des cancers de la peau (66).

Les chlorines diffèrent des porphyrines par une simple réduction de liaison d'un cycle pyrrolique. Elles possèdent un haut coefficient d'extinction, une absorption dans le rouge lointain (650-690 nm) et une bonne sélectivité dans le tissu cible. Parmi celles-ci la mono-L-aspartyl chlorine e6 (Npe6), la chlorine e6, l'éthyl étiopurpurin I (SnET₂) et la meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorine (m-THPC, Foscan®) ont fait l'objet d'études cliniques (66). Le Foscan® est approuvé pour le traitement de certains cancers de la tête et du cou. Les bactérochlorines issues d'une double réduction de liaison, absorbent à 740 nm avec un bon coefficient d'extinction et pourraient permettre de traiter des tumeurs fortement pigmentées. D'autres photosensibilisateurs porteurs d'autres modifications de la structure porphyrinique sont également à l'étude. Le LuTex appartient à la classe des texaphyrines constituées par des porphyrines dont le noyau pyrrole a été substitué par un noyau phényle. Il est en essai clinique de phase I pour diverses formes de cancer de la peau (66). Enfin le tetrasodium-meso-tetraphenyl porphinesulfonate (TPPS) est une porphyrine substituée hydrophylque, 25 à 30 fois plus efficace que l'HpD ou le Photofrin® (64).

Ces photosensibilisateurs sont d'origine synthétique totale mais d'autres sont synthétisés à partir de substances naturelles. Parmi ces composés, on trouve des dérivés de benzoporphyrine comme la Verteporfin® (benzoporphyrin derivative monoacid ring, BPD-MA) utilisée pour la dégénération de la macula liée à l'âge et qui est en essai de phase II dans les cancers cutanés (67), l'hypéricine qui est une molécule potentiellement intéressante pour le diagnostic et le traitement des tumeurs superficielles de la vessie (68) et les dérivés des chlorophylles-a ou bactérochlorophylles-a comme l'analogue alkyl éther du pyropheophorbide-a, l'HPPH (photochlor®) en cours d'évaluation en

diagnostic et traitement des cancers de la peau et des voies aérodigestives supérieures (69).

Une stratégie alternative consiste à utiliser la protoporphyrine IX (PpIX), un photosensibilisateur endogène produit au cours de la biosynthèse du protohème dont l'étape limitante est la formation d'acide 5-aminolevulinique (ALA). L'apport exogène d'ALA permet d'accroître la synthèse de PpIX et son administration peut s'effectuer par voie topique, limitant ainsi la photosensibilisation cutanée. L'ALA fut le premier photosensibilisateur de seconde génération à être commercialisé. Il est approuvé sous sa forme méthylée (Metvix®) dans le traitement des carcinomes baso-cellulaires de la peau et des kératoses actiniques. Il est actuellement évalué pour le traitement d'autres affections cutanées (MAL-PDT) (66). L'éthyl ester d'ALA (Hexvix®) est approuvé en Europe pour le diagnostic du cancer de la vessie.

Les photosensibilisateurs de troisième génération sont synthétisés à partir des molécules décrites précédemment de façon à favoriser leur accumulation dans les cellules tumorales. Ces modifications se traduisent par une addition de groupements chimiques (acides aminés, protéines, polymères, hydrate de carbone ou encore par l'introduction du photosensibilisateur dans des liposomes (70).

1.5.3. Localisation des photosensibilisateurs

1.5.3.1 Localisation intracellulaire

Les propriétés de fluorescence de la plupart des photosensibilisateurs exogènes et endogènes ont permis d'étudier leur localisation préférentielle par des techniques de microscopie de fluorescence. La distribution subcellulaire des photosensibilisateurs dépend en grande partie de leur degré d'hydrophobicité. Les photosensibilisateurs hydrophobes possèdent une forte affinité pour les membranes plasmiques à travers lesquelles ils peuvent diffuser passivement. Ils peuvent ensuite se localiser dans les structures membranaires des différents organites de la cellule. Aussi, si la membranaire nucléaire et la zone périnucléaire où se situe le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi peuvent être concernées, le noyau lui-même n'est pas un organe cible des photosensibilisateurs (71).

La mitochondrie est une cible importante de la PDT car les photosensibilisateurs qui se localisent dans la mitochondrie sont particulièrement efficaces (72; 73). De plus le rôle essentiel que joue la mitochondrie dans l'initiation de l'apoptose par la PDT est incontestable (74). L'accumulation des photosensibilisateurs dans la mitochondrie peut être facilitée par le gradient électrochimique de la membrane mitochondriale. C'est le cas pour les composés lipophiles cationiques. Des photosensibilisateurs neutres comme Pc 4 s'accumulent également dans la mitochondrie (75). Compte-tenu de leur hydrophobicité, il pourraient posséder une affinité particulière avec certains lipides tels que la cardiolipine ou le phosphatidyl glycol très présents au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (76). Ainsi, il a été montré une localisation de Pc 4 dans l'environnement immédiat de la cardiolipine (77). Les porphyrines endogènes, et parmi elles la PpIX, sont des ligands des récepteurs périphériques des benzodiazépines (PBR) localisés dans la mitochondrie. D'autres porphyrines de structure voisine de la PpIX ont également une forte affinité pour les PBR (78). L'hypéricine particulièrement hydrophobe se localise préférentiellement dans le réticulum endoplasmique après internalisation (79). Les photosensibilisateurs hydrophiles comme Npe6 ne diffusent pas au travers de la membrane plasmique et sont incorporés par endocytose. Ils sont localisés de manière préférentielle dans les lysosomes.

L'état d'agrégation des photosensibilisateurs, leur concentration extra et intracellulaire ainsi que les protocoles d'incubation sont des paramètres également susceptibles d'influencer la localisation subcellulaire. Ainsi, la durée d'incubation modifie la localisation du Photofrin®, une durée longue favorisant la localisation dans l'appareil de Golgi (80). De même la localisation de la zinc (II) phthalocyanine est mitochondriale après 24 h d'incubation alors qu'après une durée courte d'incubation (2h) la ZnPc est localisée dans l'appareil de Golgi (81).

Pendant l'irradiation, des phénomènes de relocalisation peuvent avoir lieu. Certaines porphyrines cationiques initialement localisées dans la membrane plasmique peuvent être libérées dans le cytosol (82). Il en est de même pour certains photosensibilisateurs initialement localisés dans les lysosomes (83). Récemment, les dommages photoinduits d'un dérivé porphycène (CPO) à la fois dans la mitochondrie et dans le réticulum endoplasmique ont été expliqués par la

relocalisation dans la mitochondrie de ce photosensibilisateur initialement localisé dans le réticulum endoplasmique (84).

1.5.3.2. Localisation intratissulaire

La plupart des photosensibilisateurs étant hydrophobes, il a été suggéré une liaison de ces composés avec les lipoprotéines basse-densité (LDL, « Low-Density Lipoproteins »). Les cellules néoplasiques exprimant des taux supérieurs de récepteurs aux LDL par rapport aux cellules normales, ceci pourrait expliquer le fait que les photosensibilisateurs s'accumulent préférentiellement dans le tissu tumoral (71).

L'intervalle drogue-lumière (IDL), qui est l'espace temps entre l'injection du photosensibilisateur et l'irradiation, détermine la distribution du photosensibilisateur dans les différents compartiments de la tumeur. Les temps courts, de quelques minutes à quelques heures, étant associés à une localisation vasculaire des photosensibilisateurs alors que les temps longs (> 24h) favorisent leur accumulation dans le tissu tumoral et un donc meilleur ratio tumeur/tissu sain. Une étude récente de Mitra et al (85) montre la distribution temporelle et spatiale du Foscan® dans la tumeur en fonction de la distance des vaisseaux. Ces données peuvent permettre de mieux appréhender après PDT les dommages photoinduits au niveau des compartiments vasculaire et/ou parenchymateux et leurs répercussions dans l'efficacité du traitement (85).

2. LE FOSCAN® (META-TETRA(HYDROXYPHENYL)CHLORINE, M-THPC, TEMOPORFIN)

Le Foscan® est un photosensibilisateur de seconde génération. La molécule de Foscan® (Figure 4), issue de la réduction d'une double liaison de la porphyrine correspondante, a été découverte en 1989 (62). C'est un produit pur à plus de 99 %, faiblement toxique à l'obscurité et qui présente une accumulation préférentielle dans le tissu tumoral. Le Foscan® possède un pic d'absorption dans le rouge à une longueur d'onde de 652 nm. Son coefficient d'absorption dans le méthanol est $22\,400\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$

(Tableau 1). Ces propriétés auxquelles il faut ajouter la capacité élevée du Foscan® de se maintenir dans les cellules (86) expliquent en partie l'exceptionnelle activité de ce photosensibilisateur et se traduisent par une dose photodynamique (dose de PS x dose de lumière) diminuée par rapport aux autres photosensibilisateurs.

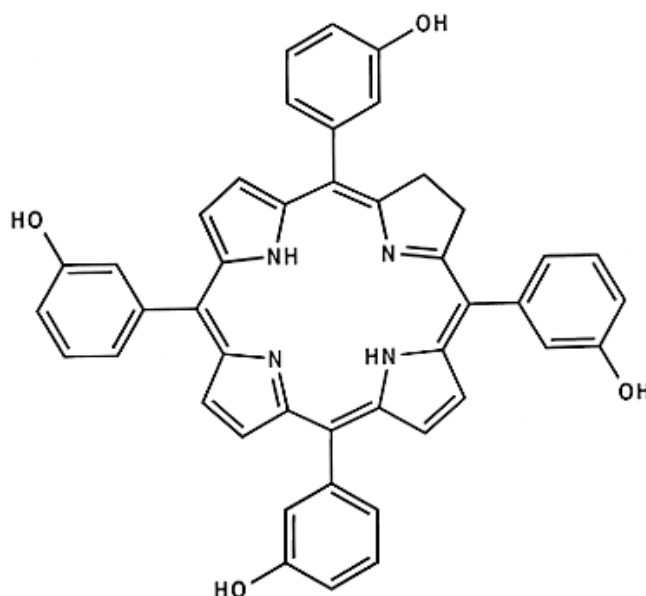


Figure 4 : Structure moléculaire du Foscan®

Le Foscan® est commercialisé par Biolitec AG (Iena, Allemagne). Il a été approuvé en 2001 par la communauté européenne pour le traitement des tumeurs de la tête et du cou n'ayant pas répondu préalablement à la radiothérapie ou à la chimiothérapie. Appliquée chez 128 patients présentant ces indications, la PDT avec le Foscan® (0,15 mg/kg, IDL = 96h) a récemment montré un bénéfice clinique important et une augmentation significative de la qualité de vie des malades, en particulier dans le cas où la taille de la tumeur était inférieure à 10 mm (87). L'avantage du Foscan® par rapport aux autres photosensibilisateurs approuvés en clinique (Photofrin®, ALA/PpIX) réside dans son effet cytotoxique élevé qui permet d'utiliser des fluences moins importantes (10-20 J/cm²). La sensibilisation cutanée est également moindre par rapport au Photofrin® (2-4 semaines). De plus, le Foscan® possède un pic d'absorption à 652 nm qui augmente la profondeur de pénétration de la lumière dans les tissus (Tableau 1).

Photosensibilisateur		Photofrin®	ALA/PpIX	Foscan®
Maximum	absorption	630	635	652
(nm)				
Coefficient	d'absorption	1 170	5 000	22 400
(cm ⁻¹ mol ⁻¹)				
Concentration	(mg/kg)	2	20 %*	0,1-0,15
IDL (h)		48-72	3-6	96
Fluence (J/cm2)		100-200	100	10-20
Irradiance (mW/cm2)		100	100-150	100
Sensibilisation cutanée		4-12 sem.	1-2 jours	2-4 sem.

*: administration topique

Tableau 1 : Caractéristiques du Foscan® comparé aux autres photosensibilisateurs approuvés pour l'utilisation clinique, Photofrin® et ALA/PpIX

Le Foscan® en PDT clinique a également été utilisé pour des cancers secondaires ou des cancers primaires multiples avec des taux de réponse complète de 67 % toutes tumeurs confondues et 85 % dans les tumeurs de stade I, réduisant ainsi la morbidité à long terme par rapport à la radiothérapie ou à la chirurgie (88). D'autres indications cliniques potentielles de la PDT avec le Foscan® ont été décrites récemment : carcinomes intraépithéliaux de la vulve (89), dysplasie de grade élevé et adénocarcinome localisé de l'œsophage de Barrett (90), carcinomes basocellulaires multiples de la peau (91), carcinomes des voies biliaires et du pancréas (92; 93), les cancers de la prostate primitifs (94) ou en rechute (essai clinique de phase I) (95).

2.1. Données pharmacocinétiques

Plusieurs études montrent que le paramètre temps entre l'injection intravasculaire du Foscan® et l'irradiation (IDL) influence fortement l'efficacité du

traitement. De manière générale, la concentration tumorale du Foscan® ne détermine pas l'efficacité de la PDT (96). Triesscheijn et al attribuent à l'effet vasculaire le bénéfice thérapeutique de la PDT avec le Foscan® (97). Cependant, l'évaluation de l'efficacité de la PDT pour différents IDL, corrélée avec les données pharmacocinétiques du Foscan® dans le plasma et la tumeur indique que l'efficacité est maximum pour les IDL 2 et 24h, ce dernier temps correspondant à une concentration maximum du Foscan® dans la tumeur. Les auteurs de cette étude présumant que le pic d'activité à 2h d'IDL correspond à un effet sur le compartiment vasculaire alors que le pic à 24 h traduit une activité directe de la PDT sur les cellules tumorales (98). Une étude de notre équipe en collaboration avec celle de Foster (85) a confirmé la distribution temporelle et spatiale du Foscan® dans la tumeur. En fonction de la distance par rapport aux vaisseaux, cette étude montre une localisation du Foscan® dans les vaisseaux 3h après injection. Six heures après injection le photosensibilisateur commence à diffuser hors des vaisseaux et à partir de 24h après injection le Foscan® est distribué dans l'ensemble du parenchyme tumoral (85).

Le profil pharmacocinétique du Foscan® dans le plasma humain se distingue nettement de celui obtenu chez la souris (99). Il est également très différent de ceux obtenus avec les autres photosensibilisateurs (99; 100). Dans le plasma humain, il semble qu'un niveau stable en Foscan® soit maintenu au moins pendant 10h alors que chez la souris une chute bi-exponentielle classique de la concentration en Foscan® soit observée (99). Cette spécificité chez l'humain a été attribuée soit à l'agrégation du Foscan®, soit à la liaison du Foscan® avec une fraction plasmatique de lipoprotéines de haute densité (HDL) immédiatement après injection, suivie d'une lente redistribution vers l'ensemble des lipoprotéines du plasma (100). Cependant l'étude de Triesscheijn et al (99) ne montre pas de différence de liaisons aux HDL entre l'humain et la souris. De plus, une augmentation du taux de LDL dans le plasma de la souris, de façon à être comparable au plasma humain, ne modifie pas la pharmacocinétique du Foscan® chez la souris. Les auteurs écartent l'hypothèse d'une influence des lipoprotéines du plasma sur la pharmacocinétique plasmatique du Foscan® (99). Les travaux de Sasnouski et al (101) montrent la persistance de formes agrégées du Foscan® en présence de serum albumine et de lipoprotéines, la désagrégation du Foscan® étant peu dépendante de la concentration en lipoprotéines (101). La cinétique de

redistribution du Foscan® entre les protéines plasmatiques et les biomembranes est lente et il est suggéré que l'incorporation du Foscan® dans les cellules endothéliales peut prendre plusieurs heures (102).

Toutes espèces confondues, le Foscan® s'accumule majoritairement dans les organes perfusés tels que les reins, les poumons et le foie (103). Le ratio de concentration tumeur/tissu sain varie de 1 à 14 suivant le modèle tumoral et le tissu sain pris en compte (98; 104).

2.2. Contribution de l'oxygène singlet dans l'effet cytotoxique de la PDT avec le Foscan®

La photocytotoxicité du Foscan® *in vitro* dépend principalement de la présence d'oxygène moléculaire. Les premiers travaux visant à identifier les espèces responsables de la phototoxicité de la PDT avec le Foscan® ont été réalisés par l'équipe de Ma et al et ont conclu à l'implication au moins partielle de l'oxygène singlet (105). Des résultats similaires ont été obtenus par Klein et al (106). Dans notre laboratoire, une étude a également montré que la photocytotoxicité du Foscan® sur des cellules d'adénocarcinome colique (HT29) était inhibée en présence d'azide de sodium, un piègeur connu de l'oxygène singlet. Ces observations ont été confortées par le fait que l'addition de piègeurs de molécules impliquées dans les réactions de type I impliquant l'anion superoxyde, le peroxyde d'hydrogène et le radical hydroxyle ne modifie pas la cytotoxicité (107). L'étude sur sphéroïdes menée par Coutier et al (30) a permis d'établir l'implication de l'oxygène dans le photoblanchiment de la molécule de Foscan®. Cette même étude a évalué à $7,9 \pm 2,2 \mu\text{M}$ d' $^1\text{O}_2$ réactif le seuil à partir duquel la PDT par le Foscan® est efficace sur les sphéroïdes (30). Le temps de vie de l'oxygène singlet dans des cellules photosensibilisées avec le Foscan® a été estimé à 0,05-0,25 μs . Dans ce modèle cellulaire, il a été établi que 9×10^8 molécules d' $^1\text{O}_2$ sont nécessaires pour réduire la survie cellulaire d'un module de log (31).

2.3. Modulation par l'irradiance de l'effet thérapeutique de la PDT avec le Foscan®

Le bénéfice de l'application de faibles irradiances a été observé pour la première fois par Van Geel et al (108) sur un modèle de souris porteuses de tumeurs RIF-1 (« radiation induced fibrosarcoma ») traitées avec 0,3 mg/kg de Foscan® et irradiées 24h après avec une dose de lumière administrée à 50 ou à 100 mW/cm² (108). Une amélioration du traitement d'environ 30 % a été observée pour l'irradiance la plus faible. Des résultats concordants ont été obtenus par Blant et al (109). Cependant, ces derniers ont observé un endommagement des tissus sains plus important. L'effet de l'irradiance sur la photocytotoxicité a été étudié *in vitro* sur des sphéroïdes Colo26 sensibilisés par le Foscan®. La comparaison des résultats obtenus avec ceux d'un modèle mathématique ont permis d'établir pour la première fois avec ce photosensibilisant la relation existant entre l'irradiance, la consommation photochimique en oxygène et la photocytotoxicité cellulaire de la PDT (30). Par la suite, des mesures directes de l'oxygénation tumorale avant, pendant et après irradiation ont été effectuées *in vivo* sur des xénogreffes tumorales. Elles ont établi que l'application de fortes irradiances réduisait la pO₂ intratumorale en cours d'irradiation alors qu'elle était maintenue à faible irradiance avec une efficacité du traitement accrue (39). Ces données suggèrent qu'il est possible de diminuer la consommation photochimique en oxygène et d'accroître l'intensité de l'effet cytotoxique de la PDT avec le Foscan® par l'application d'irradiance faible. Cependant, la modulation par l'irradiance peut être annulée si la dose de Foscan® est insuffisante pour induire une déplétion en oxygène au moment de l'irradiation (42).

2.4. Localisation subcellulaire du Foscan® et sites primaires des dommages photoinduits

La mitochondrie et la région périnucléaire furent les premiers sites identifiés de localisation du Foscan® (110). Les études de localisation menées par notre équipe par microscopie confocale de fluorescence associée à la microspectrofluorimétrie ont montré une localisation préférentielle du Foscan®

dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi de cellules d'adénocarcinome mammaire MCF-7 (111). La mesure de l'activité d'enzymes spécifiques de ces organites et de la mitochondrie a confirmé le RE et l'appareil de Golgi comme organites cibles de la PDT avec le Foscan® (112). L'observation d'une libération rapide dans le cytosol du cytochrome c de la mitochondrie laisse supposer que cet organite subit des dommages photoinduits (110 ; 113). Plus précisément, l'étude de la cinétique de la dépolarisation membranaire mitochondriale et de la libération du cytochrome c indique que la mitochondrie serait peu affectée directement par la photosensibilisation avec le Foscan® mais qu'elle est fortement impliquée dans la mort cellulaire photoinduite (112). Enfin, une étude récente, réalisée par imagerie utilisant l'anisotropie de fluorescence, révèle une localisation du Foscan® dans l'enveloppe nucléaire (114).

2.5. Modalités de mort cellulaire

In vitro, la contribution de la mort par nécrose et apoptose suite à un traitement photodynamique avec le Foscan® (1,5 µg/ml, 20h) a été étudiée par l'équipe de Leung (115). Une heure après exposition à une dose de lumière induisant 50 % de cytotoxicité (LD50), les auteurs ont montré que 10 % des cellules présentaient une morphologie nucléaire (identifiée par le colorant Hoechst 33258) typique de l'apoptose. Le pourcentage des cellules apoptotiques augmente progressivement au cours du temps et atteint 90 %, 12h après traitement. Le marquage des cellules nécrotiques par l'iodure de propidium s'est révélé négatif et les auteurs ont conclu à la prédominance de l'apoptose dans les mécanismes conduisant à la mort cellulaire (115). Des résultats similaires ont été obtenus par Chen et al sur des cellules leucémiques de souris (116). Par la suite, la même équipe a montré une rapide libération de la molécule pro-apoptotique cytochrome c corrélée avec l'ampleur de la réponse apoptotique (110). L'utilisation de différents inhibiteurs d'apoptose a permis d'observer une diminution de l'apoptose induite par Foscan®-PDT sans toutefois modifier la photocytotoxicité globale. Les auteurs suggèrent que l'inhibition de l'apoptose est compensée par une réorientation des cellules vers une mort de type nécrotique, les deux mécanismes ayant une voie d'initiation commune dont la finalité dépend de la présence ou non des principaux

médiateurs de l'apoptose, principalement les caspases actives (117). Une étude comparant cellules endothéliales microvasculaires (hMVEC) et cellules de mésothéliome humaines (HNXOE), soumises à une photosensibilisation par le Foscan® produisant la même cytotoxicité, montrent une réponse apoptotique rapide pour les cellules hMVEC alors que l'apoptose des cellules HNXOE est retardée voir absente pour les doses de Foscan® les plus élevées. Dans ce cas, les cellules HNXOE présentent une morphologie de type nécrotique (118). *In vivo*, Lilge et al ont montré la présence de cellules apoptotiques dans le cerveau de rat, 24h après Foscan®-PDT (119).

L'ensemble de ces observations montrent que, malgré le peu d'études consacrées à l'apoptose induite par la PDT avec le Foscan®, celle-ci est une voie de mort cellulaire importante qui peut influencer fortement l'efficacité thérapeutique du traitement. Les aspects moléculaires de l'apoptose induite par Foscan®-PDT sont peu connus ainsi que les paramètres pouvant moduler cette apoptose que ce soit *in vitro* ou *in vivo*. Le chapitre suivant a pour but de donner une vision claire des mécanismes de l'apoptose, puis de positionner les connaissances relatives à l'apoptose photoinduite, l'ensemble de ces données étant indispensables à la bonne compréhension des travaux entrepris dans le cadre de cette thèse consacrée à l'apoptose induite par Foscan®-PDT,

2. L'APOPTOSE

La première partie de ce chapitre est dédiée à une présentation générale de l'apoptose. Il nous a semblé que donner un aperçu exhaustif du phénomène n'était intéressant qu'à la lumière des voies de signalisation moléculaires fortement impliquées en thérapie photodynamique. C'est pourquoi la description de certains mécanismes secondaires dans l'apoptose photoinduite est volontairement abrégée. Les événements moléculaires de l'apoptose photoinduite seront traités dans le quatrième chapitre de cette thèse.

3.1. Définition

Les termes « mort cellulaire programmée » et « apoptose » ont été virtuellement synonymes pendant plus de 20 ans. Cependant, la programmation de la mort cellulaire englobe un ou plusieurs processus ordonnés et contrôlés parmi lesquels l'apoptose qui se caractérise par une morphologie particulière de la cellule en fin de vie due à la condensation du matériel nucléaire (pyknosis) suivie de sa fragmentation (karyorrhexis). L'apoptose est un mode d'élimination physiologique des cellules en excès ou anormales dans l'organisme. Son inhibition contribue au processus d'oncogénèse, aussi les cellules tumorales sont, par nature, des cellules dans lesquelles le programme apoptotique est anormal.

L'apoptose fut pour la première fois décrite par Kerr et al (120). Elle joue un rôle essentiel durant le développement et l'homéostasie tissulaire et sa dérégulation a des conséquences pathologiques telles que anomalies du développement, désordres immunitaires, maladies neurodégénératives ou cancers.

Les caractéristiques morphologiques de l'apoptose (Figure 5) sont :

- Bourgeonnement de la membrane plasmique,
- Rétrécissement cellulaire par condensation du cytoplasme et de la chromatine,
- Fragmentation de l'ADN internucleosomale,
- Formation de vésicules, les corps apoptotiques.

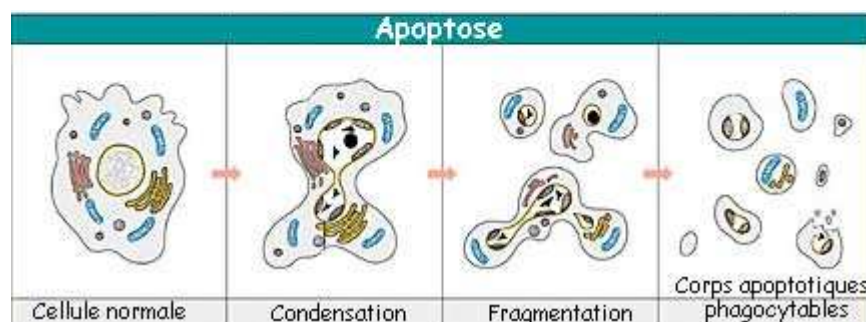


Figure 5: modifications morphologiques au cours de l'apoptose. D'après lecerveau.mcgill.ca

La membrane cellulaire garde son intégrité tout au long du processus apoptotique mais elle subit des modifications biochimiques. La plus remarquable est l'externalisation de la phosphatidylsérine, phospholipide anionique du feuillet interne de

la membrane plasmique car elle permet la détection des cellules apoptotiques par fixation de l'annexine V en présence de calcium.

L'ultime étape de l'apoptose est la phagocytose des corps apoptotiques par les macrophages ou les cellules voisines. Cette caractéristique est essentielle car elle empêche le développement d'une réponse inflammatoire dans les tissus environnants.

L'apoptose est une forme active de mort cellulaire sous contrôle génétique. Elle résulte de l'activation d'un programme préétabli d'interactions moléculaires en réponse à un stimulus.

Les acteurs moléculaires de l'apoptose sont :

- Les récepteurs membranaires « de mort »
- Les protéines cytoplasmiques
 - Caspases
 - Apaf-1
 - IAP, protéine régulatrice des caspases
 - cFLIP, protéine régulatrice de la voie extrinsèque
- Les protéines mitochondriales
 - Cytochrome c
 - Protéines régulatrices des IAPs : Smac/DIABLO, Omi/HtrA2
 - AIF, endoG
- Les protéines de la famille Bcl-2
- La protéine p53

3.2. Les caspases

3.2.1. Définition et classification

Les caspases composent la famille des « cysteiny l aspartate-specific proteases ». Ces enzymes jouent un rôle essentiel dans l'initiation et l'exécution de l'apoptose et leur activation est caractéristique de l'apoptose. Elles existent sous forme de zymogènes et, classiquement, elles doivent être clivées au niveau de résidus aspartate pour générer une enzyme active.

A ce jour 14 caspases ont été identifiées chez les mammifères. Chez l'homme, les caspases -1, -4 et -5 (-11 et -12 chez la souris) sont impliquées dans la régulation du processus inflammatoire. Les caspases -2, -8, -9 et -10 sont dites initiatrices de

l'apoptose car, en amont, elles produisent une cascade d'événements aboutissant, en aval, à l'activation des trois caspases effectrices de l'apoptose, les caspases -3, -6 et -7.

Toutes les caspases partagent des homologies structurales (figure 6). Elles sont synthétisées sous forme de pro-caspases (zymogènes) immatures. Le pro-domaine aminoterminal est suivi par une sous-unité longue d'environ 20 kDa (p20) qui comporte une séquence QACXG au sein de laquelle se situe la cystéine essentielle à l'activité de l'enzyme. Une sous-unité courte carboxyterminale d'environ 10 kDa (p10) complète la structure de ces protéines. Les caspases initiatrices de l'apoptose possèdent un long pro-domaine qui possède des motifs d'interaction protéine-protéine appelés « Death Effector Domain » (DED) et « Caspase Activation and Recruitment Domain » (CARD). Les caspases effectrices de l'apoptose se caractérisent par leur pro-domaine court.

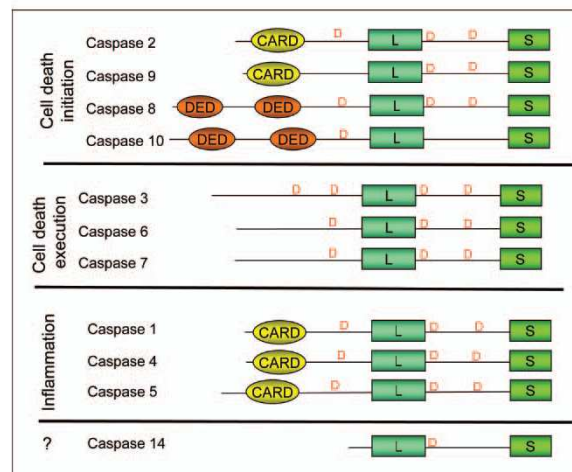


Figure 6 : Classification des caspases chez l'humain. CARD : «caspase activation and recruitment domain». DED : «death effector domain». L: sous-unité longue (p20). S: sous-unité courte (p10). D'après Jin et al (121)

3.2.2. Activation des caspases

On distingue deux grandes catégories de caspases fonctionnant en cascade. Les zymogènes dont le pro-domaine est de grande taille sont monomériques et leur oligomérisation s'effectue par l'intermédiaire d'une molécule adaptatrice interagissant avec leur pro-domaine. Cela suffit à déclencher leur activation. Le clivage du pro-domaine intervient secondairement et amplifie l'activité de l'enzyme. La seconde catégorie de caspases est constituée de pro-caspases à domaine court. Elles sont dimériques et leur activation est due à leur clivage par les caspases à pro-domaine long

(d'où le qualificatif d'initiatrices qui leur a été attribué). La caspase mature qui résulte de ce clivage est composée d'un tétramère actif, $p20_2p10_2$ (figure 7). Ce sont ces caspases (caspases-3, -6 et -7) qui sont responsables de la protéolyse de la majorité des protéines intracellulaires dégradées au cours de l'apoptose, d'où leur nom de caspases effectrices.

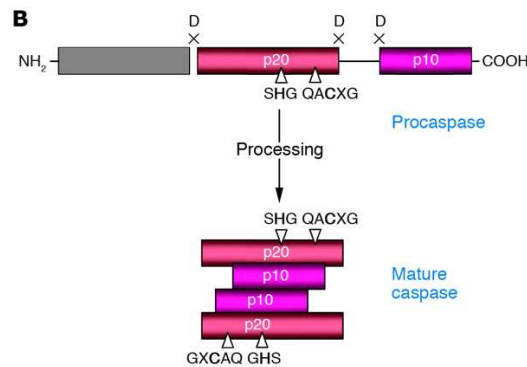


Figure 7 : Activation d'une caspase effectrice par clivages spécifiques du motif Asp-X de la pro-caspase. Formation de la caspase mature composée de l'hétérotétramère $p20_2p10_2$. D'après Lavrik et al (122)

La spécificité de chaque caspase vis à vis de son substrat est due à la reconnaissance d'un motif composé de 4 acides aminés (S4-S3-S2-S1). Le clivage du substrat se produit après le résidu C-terminal S1 qui est une asparagine (D). Le tableau suivant donne les motifs reconnus par les différentes caspases impliquées dans l'apoptose.

Caspases initiatrices	Séquence peptidique
Caspase-2	DEHD
Caspase-8	LETD
Caspase-9	LEHD
Caspase-10	LEXD
Caspases effectrices	
Caspase-3	DEVD
Caspase-6	VEHD
Caspase-7	DEVD

Tableau 2 : composition du motif de reconnaissance spécifique des caspases

Une centaine de protéines cibles des caspases ont été identifiées à ce jour. Elles appartiennent à six grandes catégories fonctionnelles :

- 1) Protéines directement impliquées dans la régulation de l'apoptose
- 2) Protéines médiatrices et régulatrices de la transduction du signal apoptotique
- 3) Protéines de structure,
- 4) Protéines de réparation de l'ADN,
- 5) Protéines régulatrices du cycle cellulaire,
- 6) Protéines impliquées dans certaines pathologies humaines.

Il est à noter que, dans le cas des substrats de classes 2, 5 ou 6, la spécificité du clivage est souvent restreinte à un type de cellules ou à un stimulus particulier. Par contre, la protéolyse de la plupart des protéines pro-apoptotiques telles que les caspases, des protéines structurelles telles que les kératines ou les lamines, et des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité de l'ADN telles que ICAD/DFF45 ou poly(ADP-ribose) polymérase (PARP) est une caractéristique générale de l'apoptose (123).

En ce qui concerne les caspases initiatrices on peut retenir l'effet protéolytique de la caspase-9 sur les autres caspases. Une étude récente montre que, *in vitro*, la dimérisation de la caspase-9 entraîne une rapide activation des caspases effectrices -3, -6 et -7 mais également des caspases initiatrices -2, -8 et -10 (124). Une autre activité remarquable concerne la caspase-8 (ainsi que la caspase-10 *in vitro*) qui génère le clivage de Bid, une protéine à BH3 isolé pro-apoptotique, dont la trans-localisation mitochondriale du fragment tBid génère la libération du cytochrome c nécessaire à l'activation des caspases post-mitochondriales (125).

Les caspases effectrices -3, -6 et -7 partagent de fortes similitudes quant à la spécificité pour leur substrat (Tableau 1). La caspase-6 est elle-même un substrat de la caspase-3. Elle possède une spécificité pour la lamine A (126) et une forte affinité pour la cytokératine 18 (127).

Les caspase-3 et -7 sont très proches à la fois dans leur structure et leur spécificité (reconnaissance du même motif DEVD). Peu d'études permettent de différencier leur rôle respectif dans l'apoptose. Récemment, il a été confirmé que la caspase-3 contrôle la fragmentation de l'ADN et les modifications morphologiques du noyau tandis que la caspase-7 jouerait un rôle important dans la perte de la viabilité

cellulaire (128) peut-être par la dégradation de plusieurs sous-unités du protéasome (129). Il a également été démontré une haute affinité de la caspase-7 avec la Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) (130). En présence de caspase-3, l'absence des caspases -6 et/ou -7 a peu d'effets sur la protéolyse des protéines impliquées dans la dégradation de l'ADN (126). Aussi, la caspase-3 est-elle reconnue comme jouant un rôle majeur dans la protéolyse de la plupart des protéines essentielles à la survie de la cellule. La fragmentation de l'ADN attribuée en grande partie à la nucléase CAD (« caspase-activated DNase ») (DFF40 chez l'homme) libérée de son inhibiteur ICAD/DFF45 après clivage de celui-ci est essentiellement due à la caspase-3 (131 ; 132). De plus, l'observation de cellules MCF-7 déficientes en caspase-3, soumises à divers traitements pro-apoptotiques, ne permet pas de visualiser la fragmentation de l'ADN et la morphologie nucléaire typiques de la cellule apoptotique (133-135). Cependant, l'absence de caspase-3 peut-être compensée en partie par l'activité des caspases -6 et -7 (136-138). Plus généralement, en cas de déficience de la caspase-3 mais aussi d'autres caspases essentielles dans la transduction du signal comme la caspase-9, des voies alternatives utilisant les ressources en caspases de la cellule peuvent se substituer au schéma classique (123). Il existe également des voies moléculaires indépendantes des caspases. On peut cependant noter que la déficience simultanée en caspase-3 et -7 dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEFs) inhibe l'apoptose par blocage des événements mitochondriaux. (128).

3.2.3. Régulation des caspases

Les protéines de la famille IAP « Inhibitor Apoptosis Protein » sont capables d'inhiber l'apoptose induite par divers stimuli. Deux mécanismes sont possibles, 1) une liaison directe qui supprime l'activité catalytique de la caspase ou 2) une activité E3 ligase conduisant à l'ubiquitination et la dégradation de la caspase cible. A ce jour, 8 IAPs sont connues chez l'humain dont XIAP, c-IAP1, c-IAP2 et la Survivin. XIAP est l'inhibiteur de caspase le plus puissant et le mieux caractérisé. L'activité des IAPs est finement régulée pendant l'apoptose en particulier par l'action inhibitrice des activateurs d'apoptose mitochondriaux Smac/Diablo ou Omi/Htra2 (121).

3.3. La voie intrinsèque

La voie intrinsèque de l'apoptose regroupe les événements moléculaires issus des dommages subcellulaires subis par la cellule convergeant vers la mitochondrie. Aussi, la mitochondrie est-elle considérée comme l'organite régulateur central de l'apoptose. Les événements essentiels mitochondriaux qui vont précipiter la cellule vers la mort apoptotique sont la perméabilisation de la membrane externe et la libération dans le cytosol de molécules solubles séquestrées dans l'espace intermembranaire. Les deux événements sont initiés et contrôlés par les protéines de la famille Bcl-2. Le schéma de la Figure 9 page 44 résume les événements moléculaires décrits ci-dessous.

3.3.1. Protéines de la famille Bcl-2

Cette famille de protéines, composée d'une vingtaine de membres chez les mammifères, peut être divisée en trois groupes (Figure 8). Leur point commun est la présence, au sein de leur structure, d'au moins un domaine BH (« Bcl-2 homology ») dont il existe quatre types (BH1 à BH4). Le premier groupe est constitué des protéines de survie (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 et A1/Bfl1) qui toutes contiennent trois à quatre domaines BH, le domaine BH4 étant une région hydrophobe carboxyterminale permettant leur ancrage dans la membrane d'organites intracellulaires comme la mitochondrie, le réticulum endoplasmique (RE) et le noyau. Le second groupe est composé des protéines pro-apoptotiques Bax, Bak et Bok qui contiennent deux à trois domaines BH. Le troisième groupe comprend au moins huit protéines ne contenant qu'un seul domaine d'homologie, le domaine BH3 d'où leur nom de protéines à BH3 isolé ou « BH3-only protein, BOP ».

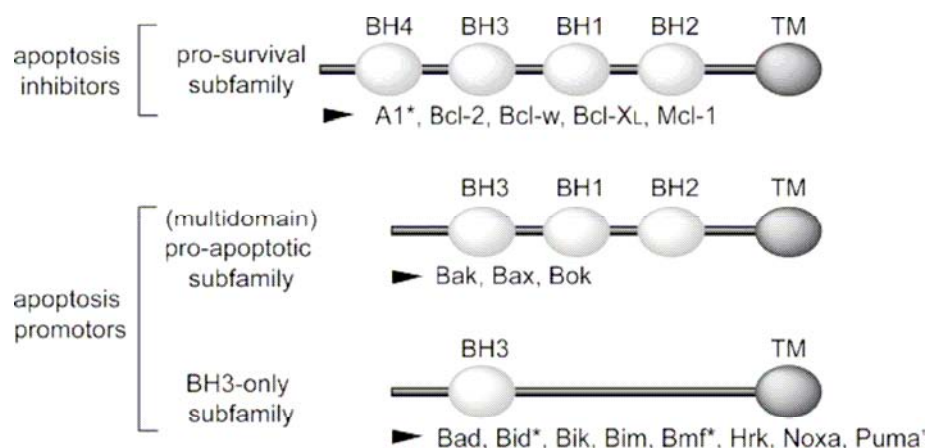


Figure 8 : Classification des protéines de la famille Bcl-2. D'après Shibue et Taniguchi (139)

L'induction de l'apoptose *via* les protéines de la famille Bcl-2 débute par l'activation des protéines à BH3 isolé (139). Dans des conditions normales, les protéines à BH3 isolé sont soit faiblement exprimées dans le cytoplasme soit y demeurent inactives. Une protéine à BH3 isolé répond à un type de stimulus précis et va être activée soit par modification post-traductionnelle (Bad, Bid, Bim, Bmf) soit par induction transcriptionnelle (Noxa, Puma, Hrk). Cette activation est suivie par une translocation au niveau de la mitochondrie. A ce niveau, les interactions avec les membres anti-apoptotiques et pro-apoptotiques à domaines multiples de la famille Bcl-2 produisent soit une neutralisation des protéines de survie (c'est le cas de Bad ou Bik) soit une activation des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak (tBid) (140).

A l'état normal, les protéines Bax et Bak existent sous forme monomères, la première dans le cytoplasme sous une forme stable et soluble interagissant avec des protéines antiapoptotiques (Ku70, humanin, 14-3-3 θ) (141), la deuxième dans la membrane mitochondriale externe où elle serait sequestrée par Bcl-x_L et Mcl-1 (140). L'activation de Bax, en particulier par tBid qui possède une action directe sur Bax (141), résulte en son insertion dans la membrane mitochondriale externe. Celle de Bak se produit grâce à la neutralisation de Mcl-1 et Bcl-x_L par respectivement Noxa et Bad (140). Il s'ensuit une oligomérisation des deux protéines Bax et Bak. Les multimères forment des pores à la surface externe de la mitochondrie (MAC « Mitochondrial Apoptosis-induced Channel ») permettant la libération du cytochrome c. La formation de ces pores ne provoque ni perte d'intégrité ni dépolarisation de la membrane mitochondriale externe (142). Le fait que des cellules déficientes en Bax et Bak aient été

montrées résistantes à l'apoptose induite via la voie mitochondriale par différents stimuli, suggère que l'activation de Bax et/ou Bak est essentielle au dysfonctionnement mitochondrial qui conditionne l'apoptose (143).

La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe n'est pas seulement dépendante de Bax et Bak, elle peut également impliquer la membrane mitochondriale interne par l'ouverture du pore de perméabilité temporaire (« Permeability Transition Pore » (PTP) sensible à l'augmentation du Ca^{2+} et/ou des espèces réactives de l'oxygène (ERO) dans le cytosol. Le PTP est un complexe comprenant les unités ANT (« Adenine Nucleotide Transporter ») sur la membrane interne et VDAC (« Voltage Dependent Anion Channel ») sur la membrane externe. La cyclophiline D (CypD) située dans la matrice de la mitochondrie, initialement décrite comme un composant du PTP, se révèle être en fait un élément régulateur dont le ligand, la cyclosporine A (CsA) désensibilise l'ouverture du pore au Ca^{2+} (142). D'autres protéines peuvent jouer un rôle régulateur comme, entre-autres, les protéines de la famille Bcl-2, les hexokinases qui catalysent les premières étapes de la glycolyse ou les récepteurs périphériques des benzodiazépines chargés du transport du cholestérol. La première conséquence de l'ouverture prolongée de PTP est la dépolarisation de la membrane mitochondriale suivie de la libération massive du Ca^{2+} stocké dans la matrice et du gonflement de la mitochondrie dû à la concentration élevée de la matrice en protéines. Finalement, des brèches dans la membrane externe de la mitochondrie produisent la libération des protéines intermembranaires comme le cytochrome c ainsi que le recrutement des membres pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Bax peut interagir avec ANT pour former un pore de perméabilisation (142). Bax mais aussi Bcl-2/x_L peuvent interagir avec VDAC pour, respectivement, ouvrir ou fermer le canal (142). En fait, il est probable que les deux mécanismes, MAC Bax/Bak dépendant et PTP coopèrent de façon simultanée ou séquentielle pour générer la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et la libération du cytochrome c (144). La surcharge en Ca^{2+} de la mitochondrie n'est pas l'unique cause de l'ouverture du PTP, cependant certains facteurs pro-apoptotiques du RE facilitent la mobilisation du Ca^{2+} et entraîne une augmentation de la propagation du signal calcique vers la mitochondrie (145). Dans ce cas, le rôle des protéines de la famille Bcl-2 qui modulent l'homéostasie calcique à la fois au niveau du RE et de la mitochondrie jouent un rôle essentiel (142).

L'activation de Bax est inhibée par les protéines de survie de la famille, Bcl-2 et Bcl-x_L. Bcl-2 est insérée dans la membrane mitochondriale de façon constitutive alors que

Bcl-x_L est une protéine mitochondriale et cytosolique. Pendant l'apoptose, Bcl-2 changerait de conformation ce qui la rendrait capable de se lier à Bax et d'inhiber son oligomérisation (146). Une surexpression de Bcl-x_L peut inhiber la translocation de Bax dans la mitochondrie et bloquer Bak par séquestration de Bad dans la mitochondrie (147). Les deux protéines, Bcl-2/x_L, sont capables d'inhiber la perméabilisation de la membrane mitochondriale, cependant Bcl-x_L bloque la perte de potentiel membranaire mitochondrial plus efficacement que Bcl-2 (148).

Finalement, il semble que la voie intrinsèque soit dépendante du ratio entre les molécules anti- et pro-apoptotiques, qui constituerait un rhéostat établissant un seuil d'entrée ou non en apoptose (121).

3.3.2. Molécules d'origine mitochondriale

Parmi les molécules libérées, la plupart sont impliquées dans l'activation des caspases post-mitochondriales. La première à avoir été identifiée est le cytochrome c (cyt c). Le cyt c est une hémoprotéine liée à la cardiolipine (CL) qui intervient dans le transport des électrons de la chaîne respiratoire entre les complexes III et IV mais aussi dans l'inhibition de la formation des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Lors de l'apoptose, la peroxydation de la CL conduisant à une perte d'affinité avec le cyt c expliquerait la libération massive et rapide du cyt c (144).

Libéré dans le cytosol, le cyt c interagit, en présence d'ATP (et plus efficacement encore en présence de deoxyATP), avec Apaf-1 (« apoptosis protease-activating factor-1 ») une protéine comportant un domaine CARD, modifiant sa conformation et favorisant son oligomérisation. Le domaine CARD de chaque molécule d'Apaf-1 réagit avec le domaine CARD de la pro-caspase 9 pour former un complexe nommé apoptosome au sein duquel la caspase-9 est activée. L'activation de la caspase-9 conduit à l'activation en cascade des caspases-3 et -7.

Le second groupe de molécules libérées de la mitochondrie sont des protéines antagonistes de IAP telles que Smac/DIABLO (« second mitochondria-derived activator of caspases/direct IAP-binding protein with low pI ») et la sérine protéase Omi/Htra2.

En complément de ces molécules activatrices des caspases, la mitochondrie libère également deux protéines pro-apoptotiques l'AIF et l'endonucléase G (endoG)

qui migrent rapidement dans le noyau où elles contribuent respectivement à la condensation de l'ADN et à sa fragmentation. Finalement, la fragmentation de l'ADN est produite par clivage internucléosomal grâce à l'endonucléase DFF40/CAD, dont l'inhibiteur DFF45/ICAD a été clivé par la caspase-3, produisant exclusivement des fragments double brin. L'endoG complète la fragmentation de l'ADN par des coupures simple brin qui génèrent également la fragmentation de l'ARN (132).

3.3.3. Rôle de p53 dans la voie intrinsèque

p53 joue un rôle majeur dans l'apoptose induite suite à aux dommages irréparables de l'ADN produits par les agents cytotoxiques. p53 subit des modifications post-transcriptionnelles en réponse à la voie de signalisation des oncogènes ou en réponse au stress génotoxique. Ceci permet une stabilisation de la protéine qui s'accumule dans le noyau et régule l'expression de gènes cibles. De nombreux gènes sont régulés par p53 en particulier ceux encodant pour certaines protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, Bax, Bid, Noxa et PUMA. Parallèlement, la protéine p53 a été trouvée dans le cytoplasme où elle peut activer Bax (149). p53 joue également un rôle inducteur pour Apaf-1 et un rôle répresseur pour Bcl-2.

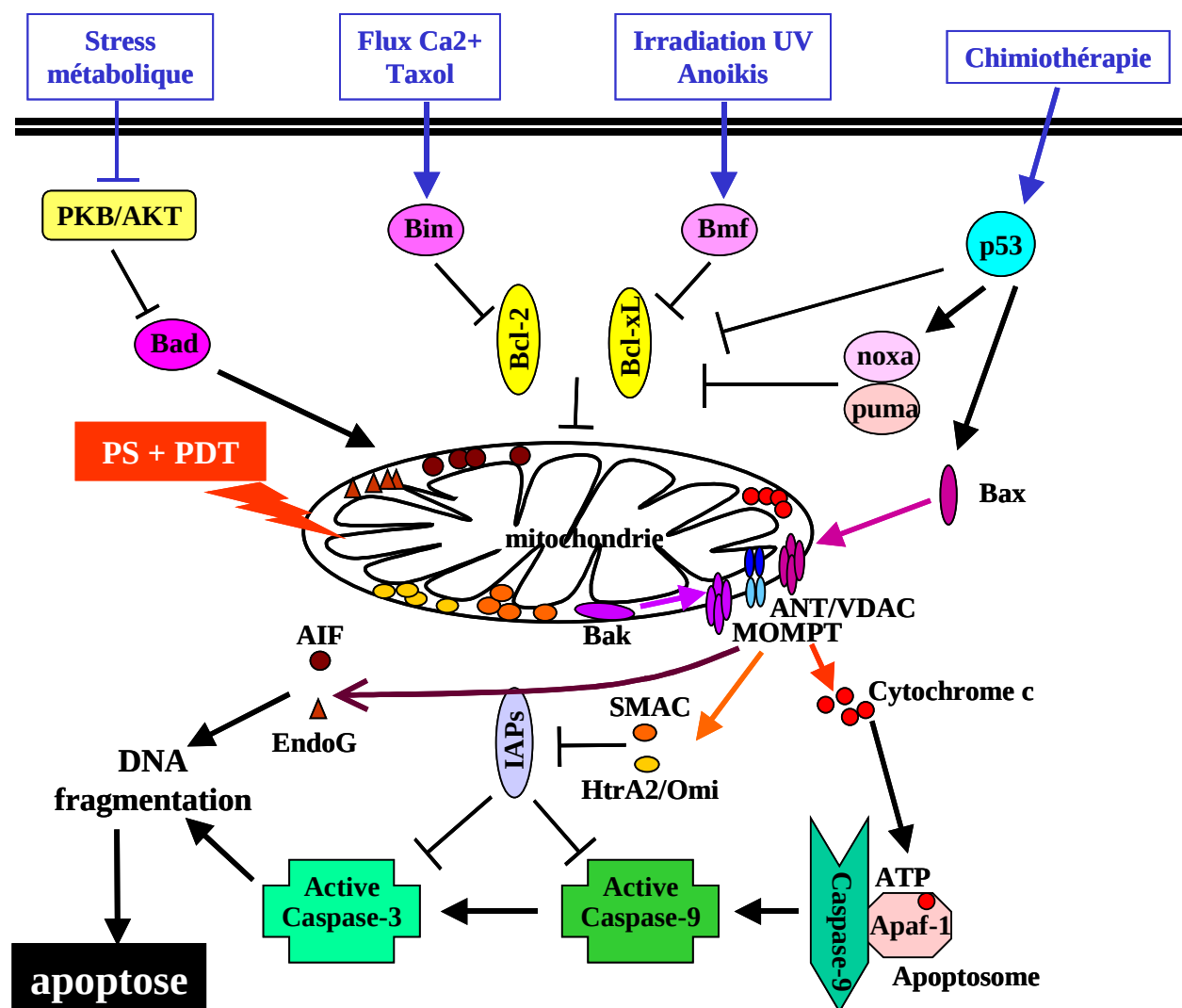


Figure 9 : La voie intrinsèque gouvernée par la mitochondrie. Adapté de Jin et al (121)

3.3.4. Signalisation dépendante du stress du réticulum endoplasmique

Le réticulum endoplasmique, par deux fonctions essentielles, peut jouer un rôle dans l'initiation de l'apoptose lors d'un stress continu (1) la régulation de l'homéostasie calcique par stockage du Ca^{2+} , (2) le contrôle de la qualité du repliement des protéines avant leur excrétion. Le stress du RE peut être d'origine oxydative ou chimique (Tunicamycin, inhibiteur de la glycolisation ; Brefeldin A, inhibiteur du transport RE-

Golgi ; Dithiotreitol, agent réducteur des ponts disulfures ; Thapsigargin inhibiteur de la pompe calcique SERCA (« Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} ATPase »). Il entraîne une perturbation de l'homéostasie calcique et une dérégulation du repliement des protéines produisant une accumulation de protéines mal conformées (« misfolded/unfolded protein ») ou oxydées. Ces anomalies provoquent une augmentation du Ca^{2+} dans le cytosol ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) due à la libération du Ca^{2+} du pool calcique du RE dans le cytosol et/ou à l'incapacité du RE de maintenir la concentration en Ca^{2+} du pool calcique ainsi qu'une réponse de type UPR « Unfolded Protein Response ».

L'augmentation du $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ est un événement majeur dans l'induction de l'apoptose car elle affecte la perméabilité de la membrane mitochondriale et provoque ainsi la libération du cytochrome c. Les oscillations du Ca^{2+} intracellulaire sont gérées via la pompe calcique SERCA qui assure l'entrée du Ca^{2+} dans le RE et via les récepteurs inositol 1,4,5 triphosphates (InsP_3R) et Ryanodine (RyR) qui assurent sa libération dans le cytosol. Aussi, l'augmentation du $[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$ suivie de l'induction de l'apoptose peut être provoquée par l'inhibition de SERCA et, à contrario, la déficience en InsP_3R peut conférer aux cellules une résistance à l'apoptose (150; 151). Cet effet pourrait être dû à l'interaction entre InsP_3R et Bcl-2 ou Bcl-x_L qui contrôlent la libération du Ca^{2+} du RE (145).

L'UPR implique (1) une synthèse réduite de protéines pour prévenir l'agrégation et l'accumulation des protéines « misfolded », (2) une induction des protéines chaperones du RE en particulier la « Glucose-Related Protein » (GRP) 78 appelée également Bip, référencée comme la première protéine induite lors du stress du RE, et des catalyseurs impliqués dans le repliement des protéines comme la PDI (« Protein Disulfide Isomerase ») et (3) une activation du système de dégradation des protéines associé au RE (ERAD, « ER-Associated protein Degradation ») pour éliminer les agrégats. Si les conditions de stress du RE sont trop intenses ou perdurent et si l'UPR ne parvient pas à rétablir l'équilibre, le déclenchement de l'apoptose devient inévitable.

L'UPR consiste en trois principaux mécanismes de signalisation initiés par trois protéines transmembranaires du RE particulièrement sensibles à tout stress subi par le RE : IRE1, PERK et ATF6. Suite aux signaux reçus par ces protéines captatrices (« sensors ») du stress du RE, trois voies de signalisation moléculaire peuvent être impliquées dans l'induction de l'apoptose : (1) la voie conduisant à l'induction de

CHOP («C/EBP Homologous Protein»), (2) l'activation de la voie JNK et (3) l'activation des caspases -12 et -7. L'ensemble de ces mécanismes sont représentés dans la figure 10 page 47.

L'induction de CHOP est activée par le facteur de transcription ATF-4 dont la synthèse est initiée sélectivement par la phosphorylation de eIF2alpha (« eukariotic Initiation Factor 2alpha ») par PERK. CHOP jouerait un rôle dans l'apoptose par l'induction de certains gènes cibles tels que GADD34 et ERO1alpha provoquant respectivement une augmentation de la charge en protéines du RE par déphosphorylation de eIF2alpha et une augmentation d'espèces réactives de l'oxygène et de protéines mal conformées contribuant ainsi à un maintien du stress du RE. De plus, il a été montré que CHOP régule négativement la protéine Bcl-2 (152).

En réponse au stress du RE, IRE1alpha recrute TRAF2 («TNF receptor associated-factor») sur la membrane du RE (Figure 10). Ce recrutement est régulé par JIK (« c-Jun NH₂-terminal Inhibitory Kinase») dont la surexpression facilite l'interaction entre IRE1alpha et TRAF2. Le complexe IRE1alpha/TRAF2 recrute alors ASK1 (« Apoptosis Signalling regulating Kinase») provoquant l'activation de la voie JNK (« c-Jun NH₂-terminal Kinase»). Cette signalisation ASK1/JNK semble spécifique du stress du RE indépendamment des voies intrinsèques et extrinsèques classiques (153).

Les mécanismes engageant la voie des caspases dépendantes du stress du RE, les caspases-12 et -7 sont encore mal définis. Les calpaïnes, cystéine protéases Ca²⁺ dépendantes, ont été montrées comme jouant un rôle dans l'activation de caspase-12 (154). TRAF2 peut également interagir avec caspase-12 et il semblerait que, durant le stress du RE, la dissociation de la procaspase-12 et de TRAF2 soit indispensable à l'activation de la caspase-12 et au recrutement de TRAF2 par IRE1alpha. Une autre possibilité réside dans l'existence d'un complexe GRP78/procaspase-12 /procaspase-7 à la surface du RE dont la rupture par un stress prolongé du RE, combiné à la présence de (d)ATP produirait une activation de la caspase-12 dans le cytosol (155; 156). Cependant, bien que la caspase-12 soit activée lors du stress du RE et que sa capacité à activer caspase-9 ait été montrée (157), son implication dans l'apoptose reste controversée (158). La caspase-12 n'étant pas fonctionnelle chez l'humain, ses fonctions pourraient être assurées par son homologue humain la caspase-4 (153). L'activation de la caspase-7 en relation avec l'expression de GRP78 a été montrée dans plusieurs études (159-161). La sur-expression de GRP78 inhibe l'activation de caspase-

7 (159; 160) tandis que la sous-régulation de GRP78 facilite l'activation de la caspase-7 (161). La rupture d'un complexe impliquant la procaspase-7 et Grp78 (155) est suggérée comme étant un élément essentiel de l'activation de la caspase-7 (160; 162).

L'étude des protéines de la famille Bcl-2 dans la régulation de l'apoptose induite par le stress du RE montrent que Bcl-2, Bax et Bak sont étroitement liées au maintien du pool calcique du RE (revue dans (150)). Bax et Bak pourrait promouvoir l'apoptose par changement conformationnel et oligomérisation dans la membrane du RE provoquant la libération du Ca^{2+} dans le cytosol, ce mécanisme étant contrôlé par Bcl-2 (163). Deux voies de signalisation peuvent alors être proposées : (1) le Ca^{2+} cytosolique génère la réaction en chaîne de l'activation m-calpaïne/caspase-12/caspase-9/caspase-3, (2) l'absorption du Ca^{2+} cytosolique par la mitochondrie provoque la dépolarisation de la membrane mitochondriale interne et la libération du cytochrome c, ce qui a pour conséquence la formation de l'apoptosome, suivie de l'activation des caspase-9 puis -3 (150).

A contrario, la surexpression de Bcl-2 et de Bcl-x_L inhibe l'apoptose (164). La suppression de l'effet antiapoptotique de Bcl-2 met en jeu 2 mécanismes : (1) l'induction de CHOP qui a été montrée comme étant un régulateur négatif de Bcl-2, (2) l'activation de JNK via IREα/TRAF2/ASK1 qui pourrait provoquer la phosphorylation de Bcl-2. Dans ce cas, Bcl-2 phosphorylée perd sa fonctionnalité permettant de se lier et de séquestrer les protéines proapoptotiques Bax et Bid ce qui entraîne l'efflux de Ca^{2+} du RE vers la mitochondrie (165). JNK peut également phosphoryler la protéine à BH3 isolé Bim, lui conférant la possibilité de neutraliser Bcl-2 et ainsi promouvoir l'activation de Bax (140; 166).

L'ensemble de ces mécanismes est représenté dans le schéma de la Figure 10.

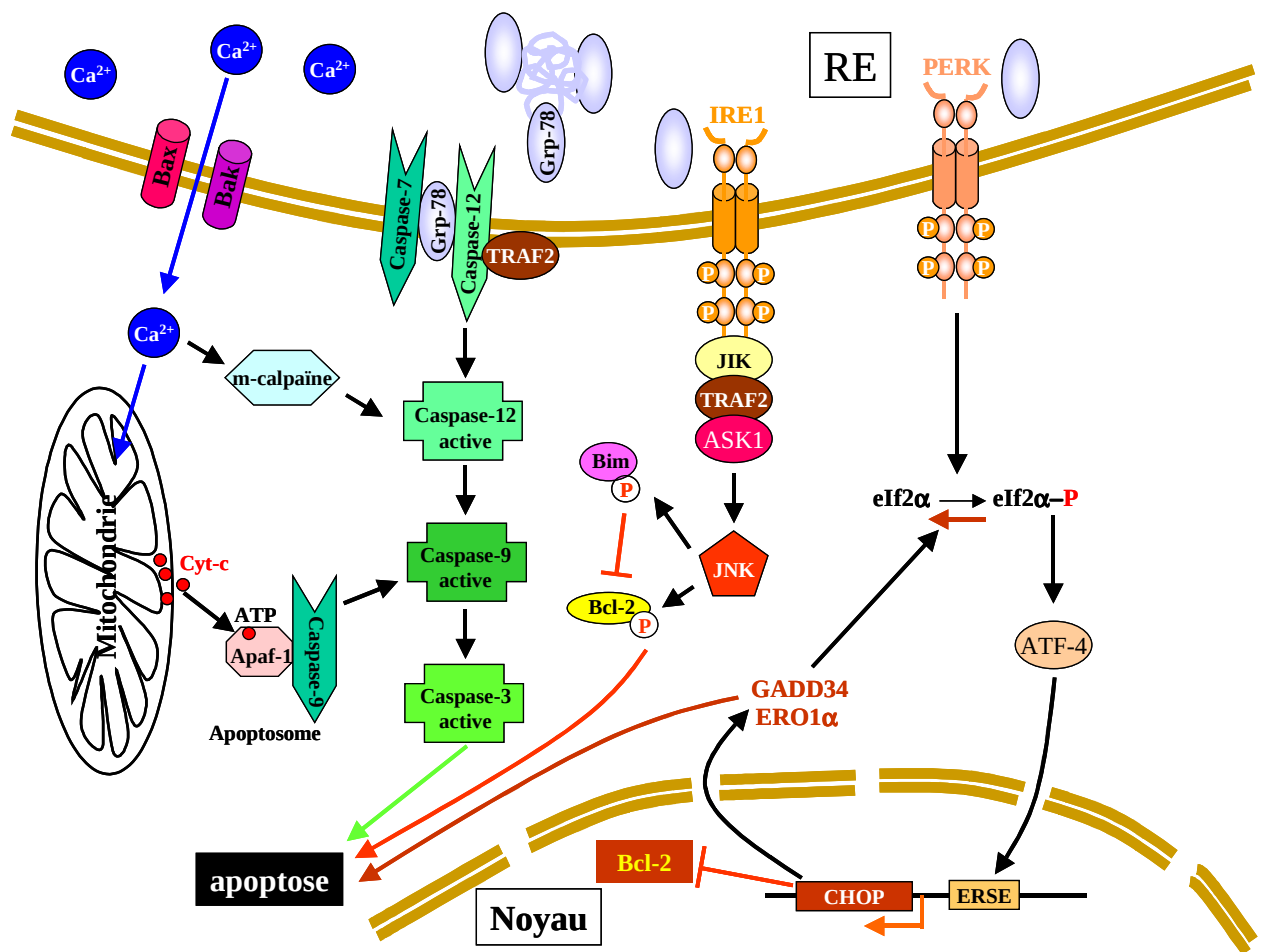


Figure 10 : La voie intrinsèque dépendante du stress du RE. Adapté de Lai et al (153)

3.4. La voie extrinsèque

La voie extrinsèque est activée par une classe de récepteurs de la membrane plasmique appartenant à la super-famille des TNFR (« tumor necrosis factor receptor »). Les principaux récepteurs et leur ligand sont donnés dans le tableau ci-dessous.

Récepteurs	Ligands
TNF-R1	TNF-alpha
Fas/CD95/Apo-1/DR2	FasL/CD95L/Apo-1L
TRAIL-R1/DR4	TRAIL/Apo-2L
TRAIL-R2/DR5	TRAIL/Apo-2L

Tableau 3 : Les récepteurs de mort de la famille TNFR et leur ligand

La composition de ces récepteurs appelés récepteurs de mort (« death receptors ») est représentée dans le schéma de la Figure 11 page 51. Ces molécules se caractérisent par un nombre variable de domaines riches en cystéine (CRDs, « cysteine rich domains ») qui favorisent la liaison entre le ligand et le domaine trans-membranaire du récepteur. Ces récepteurs possèdent dans leur portion intracytoplasmique une région conservée, le domaine de mort (DD, « death domain »). Les ligands de ces récepteurs sont également des molécules trans-membranaires. L'interaction du ligand et de son récepteur nécessite la trimérisation de chacun d'entre-eux et un domaine extracellulaire fonctionnel distinct (PLAD, « pre ligand-binding assembly domain). Le DD dépourvu de toute activité enzymatique permet le recrutement de protéines cytosoliques présentant un domaine homologue tel que FADD (« Fas-associated death domain ») qui comporte un motif aminoterminal appelé domaine « effector » de mort (DED, « death effector domain »). Le DED interagit avec un motif homologue situé dans le pro-domaine des caspases -8 ou -10. Cet assemblage tel qu'il est représenté sur la Figure 11 est appelé DISC (« death inducing signaling complex »).

Le fonctionnement du DISC a été décrit pour la première fois lors de l'étude de la voie de signalisation FasL-Fas. L'activation des caspases effectrices par Fas est différente selon les cellules. Dans les cellules de type I (ex : thymocytes) la caspase-8 peut activer directement caspase-3. Dans les cellules de type II (ex : hépatocytes) cette activation dépend du clivage de la protéine à domaine BH3 isolé Bid par la caspase-8. Le fragment c-terminal libéré, tBid, migre au niveau de la mitochondrie et provoque l'activation de Bax/Bak conduisant à la libération des molécules solubles pro-apoptotiques en particulier le cyt c qui va contribuer à la formation de l'apoptosome et à l'activation de la cascade des caspases post-mitochondriales telle qu'elle est décrite précédemment dans la voie intrinsèque. Il existe également un DISC comportant une interaction DED-caspase-10. Dans ce cas, *in vitro*, caspase-10 se comporte de façon similaire à caspase-8 mais *in vivo*, il semble que caspase-10 ne puisse pas se substituer à caspase-8 pour induire l'apoptose.

La signalisation induite par TRAIL est similaire à celle décrite précédemment pour les cellules de type II. De plus, la libération mitochondriale de Smac/Diablo est indispensable pour bloquer l'effet inhibiteur de XIAP.

La voie de signalisation pro-apoptotique induite par TNF est plus complexe. Il a été récemment démontré que l'induction de l'apoptose par TNF-R1 se déroule en deux étapes. La première implique la formation d'un premier complexe qui rapidement déclenche l'activation de NF-kappa B ou JNK. La deuxième étape consiste en une modification de ce complexe I suivie de sa dissociation du TNF-R1 pour former un deuxième complexe via la fixation du DD avec FADD. Ce complexe II conduit à l'apoptose sauf si le complexe I active NF-kappa B et ainsi produit une surexpression de l'inhibiteur FLIP_L (167).

La protéine régulatrice la plus importante de la voie des récepteurs de mort est FLIP qui existe sous deux isoformes, l'une longue cFLIP_L et l'une courte cFLIP_S. Ces isoformes contiennent des motifs DED et peuvent être recrutées au niveau du DISC (Figure 11). Selon les cas elles vont entrer en compétition ou collaborer avec caspase-8. L'effet inhibiteur de FLIP est particulièrement important dans l'apoptose induite par TRAIL ou TNF. La protéine anti-apoptotique Bcl-x_L peut également inhiber la voie extrinsèque en supprimant la formation du DISC et l'activation de caspase-8. De plus, Bcl-x_L provoquerait une sur-régulation de FLIP (168).

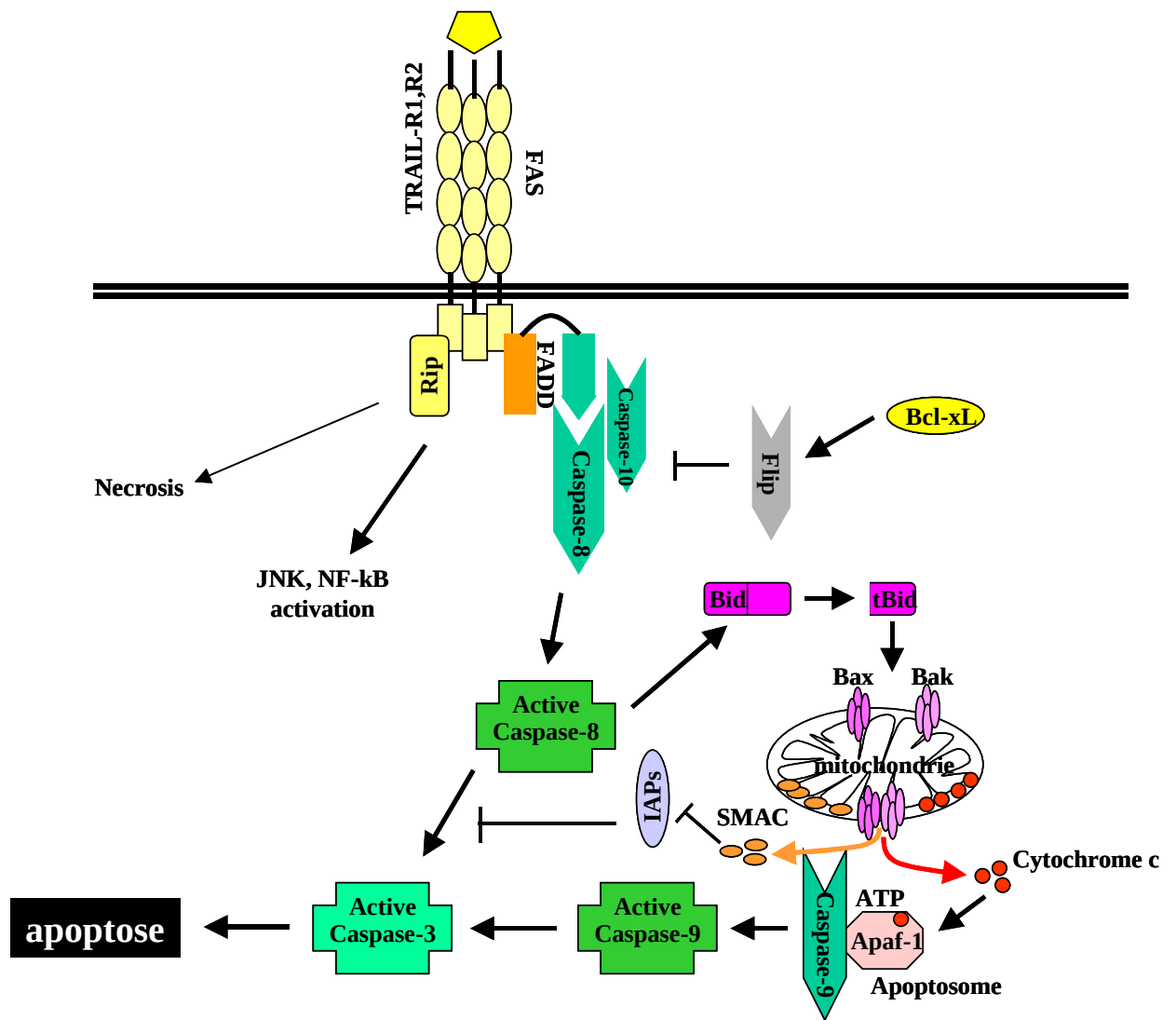


Figure 11 : Voie extrinsèque de l'apoptose. Voie moléculaire *via* Fas et TRAIL. Adapté de Jin et al (121)

3.5. Régulation de l'apoptose

Les paragraphes précédents ont décrits les voies de signalisation contribuant à l'initiation et l'exécution du programme apoptotique. D'autres voies moléculaires affectent ce processus en particulier celles contrôlées par Myc, NF-kappaB, JNK/MAPK et AKT (revue dans Jin et al (121)).

3.6. Phagocytose des cellules apoptotiques

La clairance des corps apoptotiques est orchestrée par un ensemble de gènes pouvant être divisés en deux catégories. La première catégorie comprend les gènes nécessaires à la reconnaissance de la cellule apoptotique (ced-1/ »scavenger receptor »,ced-6/GULP, ced-7/ABC-1). La seconde classe de gènes intervient dans le remodelage du cytosquelette (ced-2/CRKII, ced-5/DOCK 180 ced-10/Rac-1,ced-12/ELMO) (Figure 12). Les phagocytes reconnaissent la surface de la cellule apoptotique par des signaux « mange-moi » émis par cette dernière. Le plus connu de ce signal est la Phosphatidyl Serine (PS) à la surface de la membrane plasmatique dont la distribution dans la membrane serait régulée par ABC-1. L'implication de nombreux récepteurs de phagocytose (CD91, CD14, CD36, les intégrines $\alpha_v\beta_3$ et le récepteur phosphatidylserine (PSR)) a été démontrée. La nature non inflammatoire du processus est favorisée par la libération, par les macrophages impliqués dans la phagocytose, de facteurs anti-inflammatoires incluant TGFbeta et IL-10 (152).

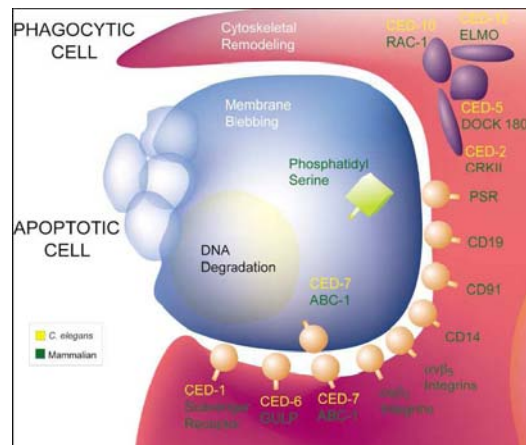


Figure 12 : La phagocytose des cellules apoptotiques. D'après Danial et al (152)

4. L'APOPTOSE INDUITE PAR LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE

L'apoptose induite par la PDT a fait l'objet de nombreux articles de revue (169-171), le dernier en date étant celui de Buytaert et al (171). Etant donné le faible rayon d'action de l'oxygène singulet, il est admis que l'apoptose est essentiellement initiée à partir des dommages oxydants générés par la PDT au niveau des sites de localisation des photosensibilisateurs, la mitochondrie, le réticulum endoplasmique et les lysosomes étant en ordre décroissant les plus susceptibles à ce processus. La voie intrinsèque est donc la voie de signalisation prédominante de l'apoptose induite par la PDT. Le tableau page suivante (Tableau 4) donne les caractéristiques des principaux photosensibilisateurs quant à leur localisation, dommages (cibles moléculaires) et événements moléculaires photoinduits de la signalisation apoptotique.

Photosensibilisateurs	Localisation subcellulaire	Cibles moléculaires	Signalisation moléculaire	Références
HpD (Hematoporphyrin Derivative)	Membrane plasmique puis mitochondrie Membrane plasmique puis Golgi	Cyt c oxidase, <i>F0F1</i> ATP synthase JNK activation	Collapse $\Delta\Psi_m$, casp-3	(172) (80)
ALA/Pp IX (5-Aminolevulinate acid / protoporphyrine IX)	Mitochondrie Relocalisation RE	PBR, ANT CL P53 Erp57 (PDI), Bcl-2	AIF, cyt c, caspases -9, -3 Collapse $\Delta\Psi_m$ - AIF caspases indépendants Calmodulin (Ca^{2+})	(173) (174) (175) (176) (177)
BPD-MA, verteporfin (Benzoporphyrin derivative monoacid ring A)	Mitochondries RE	ANT SERCA	Collapse $\Delta\Psi_m$ Bax translocation Cyt c, casp -3,-6,-7 puis Bap31 et casp-8. AIF Augmentation $[Ca^{2+}]_{cyt}$	(178) (179) (180) (181) (182) (183)
Pc 4 (Silicon phthalocyanine 4)	Mitochondries	Bcl-2, Bcl-x _L , CL	Bax translocation, collapse $\Delta\Psi_m$ Cyt c, casp -9, -3, Mcl-1 Fas/FADD/caspase-8, SAPK/JNK Smac/DIABLO	(65), revue (184)
AlPc (Aluminium phthalocyanine)	Mitochondrie	Bcl-2	Collapse $\Delta\Psi_m$, casp-3	(185)
SnET2 (Tin etiopurpurin)	Lysosomes, Mitochondries	Bcl-2	Collapse $\Delta\Psi_m$, cyt c	(186)
NPe6 (N-aspartyl chlorin e6)	Lysosomes		tBid, cyt c, casp -9, -3 puis collapse $\Delta\Psi_m$	(187)
PPME (Pyropheophorbide-a methylester)	RE/Golgi, Lysosomes,		Cyt c, casp -9, -3 puis -8	(188)
Hypericine	RE, Lysosomes	SERCA	Augmentation $[Ca^{2+}]_{cyt}$ Bax translocation, cyt c, casp-3 TRAIL Fas/FADD/casp-8	(171) (189) revue (190) (191)
CPO (9-capronyloxy-tetrakis (methoxyethyl) porphycene)	RE, Relocalisation mitochondrie	RE+mito-Bcl-2	Collapse $\Delta\Psi_m$ Augmentation $[Ca^{2+}]_{cyt}$, cyt c, casp-3	(74) (84) (192)
mTHPC, Foscan® (Meta-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin)	RE/Golgi, mitochondrie	RE-Bcl-2	cyt c, collapse $\Delta\Psi_m$,	(186) (110), (112)

Tableau 4: Localisation des principaux photosensibilisateurs, leur cibles moléculaires et leur signalisation apoptotique après PDT.

4.1. La mitochondrie cible privilégiée de la thérapie photodynamique

La caractéristique la plus représentative de l'activité photodynamique est une libération du cyt c rapide en général accompagnée de la perte du potentiel membranaire mitochondrial et du niveau d'ATP jusqu'à ce que ces dommages irréversibles entraînent la mort de la cellule. L'implication de la mitochondrie est particulièrement évidente pour les photosensibilisateurs localisés majoritairement dans cet organite comme les porphyrènes type 5-aminolevulinate acid/protoporphyrine IX (ALA/PpIX) et les composés dérivés des phthalocyanines type silicone phthalocyanine 4 (Pc 4). Le processus conduisant à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) et le rôle du pore de perméabilité temporaire (PTP) ont fait l'objet d'investigations basées sur 2 hypothèses ; (1) la forte sensibilité à la photo-oxydation des composants supposés du PTP comme l'unité ANT ; (2) l'affinité de certains photosensibilisateurs pour certaines protéines de la membrane mitochondriale pouvant jouer un rôle dans la régulation de la perméabilité temporaire. Ainsi la photo-oxydation des récepteurs périphériques des benzodiazépines (PBR) présentant une haute affinité pour la PpIX a été suggérée comme une possible cause de l'ouverture du PTP (175). L'implication de la photo-oxydation de l'unité ANT, riche en groupement thiol, dans l'ouverture du PTP a également été suggérée dans cette étude car elle a été montrée dans des mitochondries isolées traitées par verteporfin-PDT (179).

La perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie conduit à la dépolarisation de la mitochondrie. La perte du potentiel membranaire mitochondrial est soulignée dans de nombreuses études (Tableau 4). Si, pour les raisons indiquées précédemment, l'implication du PTP est probable pour les photosensibilisateurs localisés dans la mitochondrie, il n'en est pas de même pour ceux localisés préférentiellement dans les autres organites de la cellule. Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques du PTP comme la cyclosporin A qui interagit avec la cyclophilin D, et la trifluoroperazine (TPZ), inhibiteur de la dépolarisation membranaire mitochondriale provoquée par le Ca^{2+} et les ERO, agit sur des cellules traitées par Pc 4-PDT en restaurant le potentiel membranaire mitochondrial (193). De même, l'acide bongkreique (AB) agent bloquant l'unité ANT, supprime l'effet dépolarisant de la photosensibilisation par l'ALA/PpIX (175). Par contre la CsA (194; 195) ou l'AB (195), ne permettent pas de restaurer le potentiel mitochondrial après photosensibilisation de cellules traitées par l'hypéricine (194; 195). Nos travaux ont

montré que la CsA et le TPZ sont également impuissants à corriger la perte de potentiel observée après photosensibilisation des cellules incubées avec le Foscan® (112). De plus, la surexpression de Bcl-2 ne modifie pas la dépolarisation de la membrane mitochondriale des cellules exposées à l'hypericine-PDT (194).

Un mécanisme pouvant contribuer à déclencher la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et/ou la libération du cyt c, est l'activation des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, en particulier Bax et Bak. La translocation de Bax dans la mitochondrie a été reportée par plusieurs auteurs, utilisant des photosensibilisateurs variés (180; 186; 196; 197). La nécessité de la présence de Bax a été démontrée par l'utilisation de cellules Bax négatives comme les cellules de cancer prostatique humain DU-145 (197) ou MEFs DKO Bax^{-/-}/Bak^{-/-} (171). Ces cellules sont résistantes à l'apoptose photoinduite respectivement par Pc 4 (197) et hypericine (196). Bien que Bak ne semble pas pouvoir se substituer à Bax pour la libération du cyt c (65), la dépolarisation de la membrane mitochondriale et une voie alternative d'apoptose caspase dépendante plus lente et moins efficace ont été observées (198). Le contrôle étroit de l'activation de Bax par la protéine anti-apoptotique Bcl-2 laisse supposer que le ratio d'expression des deux protéines, Bax/Bcl-2 est un élément clé de l'entrée en apoptose. Une perte immédiate après photosensibilisation de l'expression mitochondriale de Bcl-2 a été montrée pour plusieurs photosensibilisateurs (Tableau 4) en particulier pour Pc 4 (199), CPO ou SnET2 (186). La photo-dégradation de la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L par Pc 4 a également été observée (200). Les autres protéines de la famille Bcl-2 impliquées dans le fonctionnement de la mitochondrie en particulier Bax et Bak ne sont pas photo-endommagées malgré la similitude de leur structure avec Bcl-2/x_L (201). Ceci montre que la proximité de la protéine cible avec le photosensibilisateur est un facteur essentiel de la photo-dégradation. L'expression et la fonctionnalité de Bax demeurant intacte le ratio Bax/Bcl-2 serait par conséquent favorable à l'apoptose photoinduite. Ceci expliquerait l'inefficacité de la sur-expression de Bcl-2, qui induit également une sur-expression de Bax, à protéger les cellules traitées par Pc 4-PDT (202) ou AlPc-PDT (185) de l'apoptose photoinduite.

La dépolarisation de la membrane mitochondriale est en général accompagnée par la libération du cyt c dans le cytoplasme (Tableau 4). Cependant, une dissociation entre les deux phénomènes peut exister (187; 203 ; 204). La rapidité et l'aspect massif de la libération du cyt c dans le cytosol est une caractéristique de l'apoptose photoinduite par les photosensibilisateurs localisés préférentiellement dans la

mitochondrie. Le fait que, pour divers composés appartenant à cette catégorie, ALA/PpIX (174), AIPcS (4) (205) et Pc 4 (77), il ait été montré une proximité entre le site de production de l' $^1\text{O}_2$ et la cardiolipine positionne cette dernière comme cible immédiate de l' $^1\text{O}_2$ généré lors de l'irradiation en présence de ces photosensibilisateurs. L'oxydation du complexe cyt c-cardiolipine positionné sur la membrane mitochondriale interne est envisagée comme un (ou peut-être l') événement létal critique de la photoinactivation par Pc 4 (65).

Une autres voie pouvant conduire à la perméabilisation de la membrane mitochondriale impliquant l'activation de Bax est celle impliquant l'accumulation de ceramides dans la cellule. Une accumulation de sphingolipides, ceramides ou sphinganine dans la cellule après photosensibilisation a été montrée pour Pc 4 (206; 207) et PPME (188) mais leur rôle dans l'apoptose photoinduite reste incertain (188).

Parmi les autres molécules pro-apoptotiques libérées par la mitochondrie, la présence de Smac/Diablo dans le cytosol a été mise en évidence après Pc 4-PDT (184). Après PDT utilisant ALA/PpIX, la libération du cyt c et de l'AIF a été observée mais pas celle de Smac/DIABLO, Omi/HtrA2 ou EndoG. L'AIF serait à l'origine d'une voie indépendante des caspases (175) qui pourrait se développer simultanément avec la voie cyt c-caspases dépendante (173). La libération de l'AIF conjointement avec le cyt c a également été observée rapidement après photosensibilisation par la verteporfin (182).

Suite à la libération du cyt c dans le cytosol, la cascade d'activation des caspases post-mitochondriales est souvent rapportée (Tableau 4). En absence de caspase-3, comme c'est le cas dans les cellules MCF-7, la photosensibilisation par Pc 4 provoque une libération du cyt c rapide et massive identique à celle obtenue dans les MCF-7 transfectées avec caspase-3. Par contre le clivage de PARP, ainsi que la fragmentation internucléosomale de l'ADN ne sont pas observés (208).

L'ensemble de ces travaux montrent l'importance du rôle de la mitochondrie dans l'apoptose induite suite au stress oxydant produit par la PDT. On peut également constater le peu de données publiées en ce qui concerne le Foscan®, même si ce photosensibilisateur ne possède pas une localisation majoritairement mitochondriale.

4.2. Rôle du stress oxydant du RE dans l'apoptose photoinduite

La mitochondrie contribue à la régulation du niveau intracellulaire de Ca^{2+} en relation étroite avec le RE. Aussi, les photo-dommages produits au niveau du RE,

organite cible de certains photosensibilisateurs (Tableau 4) sont potentiellement générateurs d'altération de l'homéostasie calcique de la cellule. Une rapide augmentation du Ca^{2+} cytosolique ($[\text{Ca}^{2+}]_{\text{cyt}}$) suite à la photosensibilisation de cellules traitées par verteporfin (183), CPO (192) ou hypéricine (196) a été observée. Cette libération pourrait être attribuée à trois mécanismes photoinductibles.

(1) Altération de la machinerie responsable du transport du Ca^{2+} suite à la photo-oxydation des groupements thiol présents dans les sites Ca^{2+} -ATPase où semblent se fixer préférentiellement les porphyrines (209). Cette hypothèse est soutenue par la perte d'expression de la pompe calcique Serca2 ATPase immédiatement après irradiation de cellules incubées avec verteporfin (183) ou hypericine (196), ce qui suggère une haute sensibilité de cette enzyme riche en groupements thiol aux dommages photo-oxydants générés par la PDT.

(2) Activation de Bax au niveau du RE (192) qui stimule la libération du pool calcique du RE par un mécanisme contrôlé par Bcl-2. Dans ce cas de figure, la perte photoinduite de Bcl-2 fonctionnelle localisée dans le RE montrée pour deux photosensibilisateurs préférentiellement localisés dans le RE, CPO et Foscan® (186), pourrait jouer un rôle en altérant sa capacité à bloquer la libération du Ca^{2+} (192). A noter que hypéricine (210) ou PPME (188) malgré leur localisation dans le RE ne produisent pas de photo-dégradation directe de Bcl-2 ce qui souligne l'aspect sélectif du phénomène qui serait fonction de la nature du photosensibilisateur et de son affinité pour Bcl-2 (171). Cependant, pour ces deux photosensibilisateurs, une phosphorylation photoinduite de Bcl-2 a été décrite après PDT (188; 210).

(3) Dommage photoinduit du RE non spécifique provoquant une libération du Ca^{2+} (192). Le rôle de l'influx du Ca^{2+} du RE vers la mitochondrie dans l'initiation et le développement de l'apoptose photoinduite reste incertain, l'utilisation de chélateurs ou d'inhibiteurs de transport du Ca^{2+} n'ayant pas abouti à une limitation du processus (183; 192).

La libération rapide du Ca^{2+} à partir des pools intracellulaires RE ou mitochondrie peut impliquer différentes voies de signalisation calcium dépendantes (171). Ainsi des inhibiteurs dirigés contre la phospholipase C, la PKC ou la phospholipase A_2 cytosolique (cPLA₂) contribuent à diminuer la mort cellulaire par apoptose (171). L'activation des calpaïnes, cystéine protéases Ca^{2+} dépendantes, a également été rapportée mais ne semble pas jouer un rôle majeur dans l'apoptose photoinduite (171). L'implication de la protéine membranaire du RE, Bap31, a été

suggérée dans une étude utilisant la photosensibilisation avec la vertéporfin. Dans ce cas, Bap31 est clivée par caspase-8. Cette voie pouvant provoquer la fission mitochondriale Ca^{2+} dépendante se déroule à posteriori, alors que la libération du cyt c et l'activation de la caspase-3 ont déjà été observées (181). Ces résultats suggèrent que ce type de mécanisme « cross talk » ER-mitochondrie peut amplifier la cascade d'activation des caspases (171).

La réponse au stress oxydant produit par la PDT s'exprime également par l'induction de HSPs (« Heat Shock Proteins ») (177; 211-215) et de protéines chaperones du RE, GRP78/Bip (216; 217), GRP94 et calnexine (216). A contrario, d'autres protéines chaperones du RE, calreticuline et PDI ont été montrées sous régulées (218) ou carbonylées (219) par la PDT. Ces observations suggèrent fortement qu'une réaction de type UPR pouvant conduire à l'apoptose puisse être générée par la cellule. L'induction de CHOP (171; 217) et le fait que les cellules CHOP^{-/-} soient plus sensibles à l'apoptose photoinduite que les cellules CHOP^{+/+} confortent cette hypothèse (217). Une étude génomique (« oligonucleotide microarray analysis ») récente dans des cellules de cancer de la vessie traitée par hypericine-PDT montre l'induction de la voie de signalisation PERK/eIF2alpha/ATF4/CHOP (171). Dans cette même étude, les auteurs suggèrent que la perte par photo-oxydation de la pompe calcique SERCA conduisant à une déplétion rapide et prolongée du pool calcique du RE, pourrait être à l'origine de l'accumulation de protéines oxydées ou mal conformées qui générerait l'UPR (171).

L'autre voie de signalisation mise en évidence suite au stress oxydant généré par la PDT est l'activation de la caspase-12 qui a été observée par Mak et al (216).

En raison de la localisation du Foscan® dans le RE/Golgi, l'apoptose liée au stress oxydant du RE est particulièrement intéressante. A notre connaissance, aucune donnée n'a été publiée dans ce domaine.

4.3. Implication de p53 dans l'apoptose induite par la PDT

S'il a été suggéré que p53 sensibilise certaines cellules cancéreuses à la PDT, un consensus s'est établi sur l'indépendance du processus apoptotique induit par la PDT vis à vis de p53 (169). Cependant, une étude récente rapporte l'interaction de la PpIX avec p53 provoquant la rupture de la liaison de p53 avec HDM2, inhibiteur de p53

(176). Les auteurs suggèrent que la PDT peut induire à la fois un processus apoptotique p53 dépendant et indépendant (176).

4.4. Voie extrinsèque dépendante des récepteurs de mort cellulaire

L'implication de la voie de signalisation dépendante des récepteurs de mort cellulaire suite à la PDT a été décrite avec de nombreux photosensibilisateurs (revue dans Buytaert et al (171) et Oleinick et al (169)) et il ne fait aucun doute qu'elle contribue à la réponse apoptotique induite par la PDT même si elle n'est ni prééminente (65; 180; 220) ni indispensable comme le démontre l'inefficacité de l'inhibition de la caspase-8 dans l'induction de l'apoptose photoinduite par l'hypericine (221). Cependant, certaines études placent la voie extrinsèque et l'activation de caspase-8 en amont de la voie mitochondriale et de l'activation de la caspase-3 (191; 222; 223). La prééminence de l'une ou l'autre voie suite à l'induction de l'apoptose par la PDT pourrait en partie être expliquée par la localisation du photosensibilisateur et/ou le type de cellules soumises à la PDT. A cet égard, la localisation dans la membrane plasmique du Rose Bengal (223) ou l'utilisation de cellules Jurkat photosensibilisées par l'hypericine (190) pourraient expliquer la prépondérance de la voie extrinsèque.

4.5. Place de l'apoptose dans la mort cellulaire induite par la PDT

Bien que l'apoptose soit décrite comme un processus majeur de la mort cellulaire induite par la PDT, certaines études montrent que l'altération ou la suppression de l'apoptose n'engagent pas une protection contre la mort cellulaire après PDT (196-198; 208). Ces observations indiquent d'une part que les événements moléculaires provoquant la mort cellulaire sont en amont de la voie apoptotique mitochondriale et d'autre part que la nature moléculaire des dommages photo-induits a une importance essentielle sur les voies de signalisation qui vont engagées la cellule dans un mode de mort cellulaire programmée spécifique.

4.5.1 Mort cellulaire programmée de type II : l'autophagie

L'autophagie se produit dans la plupart des cellules eucaryotes où organites et autres composants de la cellule sont séquestrés dans les lysosomes et dégradés. Elle constitue le mécanisme principal du renouvellement des protéines de longue vie et des organites cellulaires. Elle intervient durant le développement et la différenciation, dans la production d'acides aminés lorsque les nutriments sont limités et dans l'élimination des molécules ou organites endommagés ou en surnombre. L'autophagie est stimulée en réponse à différents stress et joue un rôle cytoprotecteur en recyclant les macromolécules pour obtenir des nutriments destinés à la production d'ATP et maintenir les processus métaboliques nécessaires pour limiter les dommages cellulaires. Cependant, l'autophagie peut également conduire à une mort cellulaire programmée, dite de type 2, en conjonction avec l'apoptose (mort cellulaire programmée de type 1). Elle agit grâce à la formation de vésicules autophagiques ou autophagosomes formés à partir de l'assemblage et l'expansion de structures bi-membranaires du RE. Ces autophagosomes encapsulent les matériels cytosoliques et fusionnent avec des lysosomes ou vacuoles où leur contenu est dégradé.

Des études récentes ont montré que la PDT pouvait induire un processus autophagique lié à la mort cellulaire (196; 224; 225). De plus, l'induction de gènes impliqués dans l'autophagie a été récemment montrée par oligonucléotide microarrays appliqués à des cellules de cancer de vessie traitées par hypericine-PDT (171). Ce même traitement appliqué à des cellules déficientes pour l'apoptose, Bax^{-/-}/Bak^{-/-} montrent un développement de l'autophagie (196). Des résultats similaires ont été observés dans des cellules DU-145 Bax déficientes traitées par CPO-PDT (226) ou Pc 4-PDT (225) ainsi que dans les cellules MCF-7 caspase-3 déficientes traitées par Pc 4-PDT. Des cellules compétentes pour l'apoptose ont également montré la présence d'autophagosomes après Pc 4-PDT (225) ou CPO-PDT (224).

4.5.2 Mort cellulaire programmée de type III : la nécrose

La nécrose est traditionnellement considérée comme une forme de mort cellulaire passive et non régulée. Elle est caractérisée morphologiquement par un gonflement de la cellule, une vacuolisation du cytoplasme et la perte d'intégrité de la membrane plasmique. La rupture de la membrane plasmique libère le contenu

intracellulaire dans l'espace extracellulaire produisant une inflammation constituée par l'activation de phagocytes et l'attraction de leucocytes dans l'aire nécrotique (227). Un exemple classique de conditions nécrotiques est l'ischémie qui conduit à une déplétion en oxygène, glucose et autres facteurs trophiques et provoque la nécrose massive des cellules endothéliales et des cellules non prolifératives des tissus environnants (228). La mort nécrotique n'est pas seulement liée à des conditions pathologiques mais peut également se produire lors de certains processus physiologiques et se substituer à l'apoptose durant le développement. Aussi, les études montrant que la nécrose peut résulter d'un programme régulé sont de plus en plus nombreuses (revue dans Proskuryakov et al (228)). De nombreux agents peuvent générer à la fois apoptose et nécrose. Plusieurs molécules liées au processus apoptotique peuvent être impliquées dans la nécrose ce qui rend possible une modulation des voies de signalisation de façon à favoriser l'une ou l'autre forme de mort cellulaire (revue dans Proskuryakov et al (228)).

La diminution de l'apoptose photoinduite parallèlement à l'augmentation de la mort par nécrose est caractéristique de l'augmentation de l'intensité de la dose de PDT (81 ; 229). La localisation des photosensibilisateurs est également un facteur déterminant. Ainsi l'inactivation des procaspases -9 et -3 due à la relocalisation dans le cytosol, pendant l'irradiation, de photosensibilisateurs localisés dans la membrane plasmique a été montrée comme favorisant la mort par nécrose (82). La nécrose étant associée à la perte précoce de l'intégrité de la membrane plasmique ce mode de mort cellulaire est prédominant après PDT lorsque les photosensibilisateurs sont localisés massivement dans la membrane plasmique (72; 80; 81; 174; 230). Nécrose et apoptose sont également dépendants du type d'espèces réactives de l'oxygène impliquées. Une augmentation de la durée de vie de l' $^1\text{O}_2$ produit au niveau du RE/Golgi augmente la mort par nécrose des cellules alors que les autres espèces réactives de l'oxygène, produites au niveau de la mitochondrie, sont impliquées dans l'apoptose (188).

4.6. L'apoptose photo-induite *in vivo*

La présence de cellules apoptotiques dans des tumeurs traitées par PDT a été observée pour plusieurs photosensibilisateurs et tumeurs d'origines différentes (revue dans Oleinick et al (169) et mise à jour dans le Tableau 5, page suivante). Quelque soit

le photosensibilisateur utilisé et le type de tumeur traité, l'apoptose est observée dans les 36 heures post-PDT et précède l'apparition de la nécrose et de la régression tumorale (169). Les données du tableau 5 montrent que les observations morphologiques provenant de l'histologie standard ou de la microscopie électronique ont été confortées par les techniques biochimiques (fragmentation de l'ADN, mise en évidence de l'expression des protéines d'intérêt par western-blot) puis par les techniques immunohistochimiques récemment introduites dans la pratique anatomo-pathologique.

Photosensibilisateurs	Modèles animaux	Marqueurs	Références
Photofrin®	U87 glioblastome intracerebral, souris	TUNEL	(231)
	Carcinome épidermoïde, souris	TUNEL, Fas/FasL	(232)
	Sarcome humain, souris « nude »	TUNEL	(233)
ALA/Pp IX	Gliosarcome sous-cutané, rat	TUNEL	(234)
	Adénocarcinome colique Colo-26, souris	Histologie, Fragmentation ADN	(235)
mTHPC PEG conjuguée	Adénocarcinome du sein, souris	Immunohistochimie : CK-18 clivée	(236)
Photofrin® ALA/Pp IX, MTHPC AlCIPc, SnET₂	Cerveau normal Tumeurs intracrâniennes VX2, souris	TUNEL	(119)
Verteporfin	neovascularisation choroïdale rat	TUNEL Immunohistochimie : Caspase-3 active Caspase-9 active, pAkt	(237)
Npe6	Tumeur humaine glandes salivaires, souris « nude »	Immunohistochimie : CK-18 clivée	(238)
HPPH (2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide)	Adénocarcinome colique (colo-26), souris	TUNEL Immunohistochimie : Caspase-3 active	(53)
Hypéricine	RIF-1 (Radiation Induced Fibrosarcoma), souris	TUNEL Fas/FasL	(239)
Pc 4	RIF-1, souris	Histologie, ME Fragmentation ADN Western-blot, PARP	(240)
	Tumeur peau, souris	Histologie, ME Fragmentation ADN	(241)
	Carcinome ovaire humain OVCAR-3, souris « nude »	Fragmentation ADN Western-blot PARP	(242)
	Adénocarcinome colique humain SW480, souris « nude »	Fragmentation ADN Western-blot PARP	(243)
	Lymphome cutané, homme	Western-blot Caspase-9 Caspase-3, PARP TUNEL Immunohistochimie : Caspase-3 active	(244) (65)

Tableau 5 : L'apoptose induite par la PDT *in vivo*

Les études récentes entreprises *in vivo* tendent vers trois objectifs :

- (1) La quantification et la localisation de l'apoptose (cellules tumorales/vaisseaux),
- (2) La corrélation de la réponse apoptotique avec l'efficacité du traitement,
- (3) L'étude des voies de signalisation impliquées dans le processus apoptotique, corroborer leur pertinence par rapport aux études *in vitro*.

(1) L'évaluation de l'apoptose dans les tissus est souvent effectuée par la méthode TUNEL. Deux études récentes soulignent l'intérêt d'utiliser l'anticorps M30 (CK18 clivée) en immunohistochimie pour détecter l'apoptose précoce (dès 2 heures après PDT) et l'évolution du processus dans le temps (236; 238). Etablir une « cartographie » de l'apoptose dans les tumeurs est une donnée intéressante compte-tenu des dommages vasculaires et/ou tissulaires générés par la PDT (53; 233). Certains auteurs suggèrent que l'apoptose des cellules tumorales est un phénomène consécutif à l'hypoxie produite par l'arrêt du flux sanguin (233; 239). Henderson et al (53) observent qu'à forte irradiance (112mW/cm^2) les cellules apoptotiques sont groupées à proximité des vaisseaux alors qu'à faible irradiance (14 mW/cm^2) l'apoptose est distribuée dans tout le volume tumoral. Les régions tumorales distantes des vaisseaux semblent donc protégées de l'effet PDT généré par l'irradiance la plus forte ce qui laisse supposer une influence majeure de l'oxygénation des tissus pendant la PDT sur l'efficacité du traitement (53). Enfin, les cellules apoptotiques peuvent être localisées majoritairement autour des foyers nécrotiques (119; 232). Ceci laisse supposer que les zones recevant de hautes doses de PDT deviennent nécrotiques alors que les tissus environnants sont apoptotiques (119) ou que les foyers nécrotiques sont composés des cellules mortes ayant subi l'apoptose (232).

(2) L'étude de Henderson et al (53) montre que le nombre de cures tumorales est supérieur à faible irradiance, une condition de traitement qui maintient l'oxygénation des tumeurs. Dans ce cas, un niveau plus élevé d'activité apoptotique est mesuré et correspond à une réaction inflammatoire minimale (53). L'effet apoptose/efficacité du traitement en fonction de l'irradiance/oxygénation est conforté par les résultats obtenus par la mesure de la production d' $^1\text{O}_2$ pendant l'ALA/PpIX-PDT. Yamamoto et al (234) montrent que, comparée à une forte irradiance (120 mW/cm^2), une faible irradiance (30 mW/cm^2) produit, de façon cumulée, plus d' $^1\text{O}_2$, ce qui induit un effet photodynamique supérieur et favorise l'apoptose (234). Miller et al (65) émettent l'hypothèse que l'étendue de l'apoptose ciblant les cellules tumorales pourrait être corrélée à la réponse tumorale après PDT. En effet, si le nombre de cellules tumorales marquées par la

caspase-3 active est similaire dans les tumeurs de lymphome cutané non traitées de deux patients l'un sensible et l'autre résistant au traitement par Pc 4-PDT, il augmente après traitement et cette augmentation est significativement supérieure dans les lésions sensibles au traitement. Ce résultat suggère que la caspase-3 active détectable en immunohistochimie pourrait être un biomarqueur de l'activité de la PDT *in vivo* lors d'essais cliniques et un possible facteur prédictif de la réponse clinique au traitement (65).

(3) Les voies de signalisation font l'objet de plusieurs études (232 ; 237; 239; 244; 245). L'activation des caspases -9 et -3 est montrée par immunohistochimie dans les cellules apoptotiques positives au TUNEL. La déphosphorylation d'Akt apparaît 1 heure après traitement. Les auteurs suggèrent que la PDT conduit à la déphosphorylation d'Akt, ce qui favorise l'activation de la voie dépendante des caspases (237). La voie extrinsèque de l'apoptose impliquant le récepteur de mort cellulaire Fas/FasL a montré une corrélation entre les cellules apoptotiques marquées par le TUNEL et les cellules positives pour Fas et FasL (232; 239). Enfin, il est intéressant de noter que la réponse de la tumeur à Pc 4-PDT n'est dépendante ni de la présence de procaspase-3 (245) ni de celle de p53 (244), ce qui corrobore les résultats obtenus *in vitro* (169).

4.7. Evaluation des techniques de marquage de l'apoptose en histologie

Les techniques d'évaluation de l'apoptose *in vivo* connaissent une évolution importante depuis quelques années. Elle repose sur des technologies appartenant à trois grands domaines distincts qui possèdent leurs avantages et leurs inconvénients :

1) L'analyse en western-blot est incontournable car elle seule offre la possibilité d'étudier, sur un même échantillon, plusieurs événements moléculaires impliqués dans la transduction du signal. Cependant, elle repose sur un extrait protéinique, obtenu par broyage de l'échantillon, qui ne tient pas compte de la composante tissulaire.

2) L'imagerie moléculaire est en plein essor. Ces techniques présentent l'avantage d'être non invasives et de pouvoir détecter l'apoptose en temps réel. L'annexin V radio-marquée détectée par tomographie par émission simple de photons (SPECT) est la méthode actuellement la plus développée. La résonance magnétique est

également prometteuse. Les inconvénients de ces techniques d'imagerie moléculaire sont leur spécificité et sensibilité encore insuffisantes (246).

3) Les analyses sur coupes histologiques sont les plus répandues. Les techniques basées sur la fragmentation de l'ADN sont largement employées. Le développement d'anticorps spécifiques utilisables en immunohistochimie dirigés vers certaines cibles moléculaires majeures activées lors de l'apoptose permet, depuis peu, d'améliorer la sensibilité de la détection.

En dépit d'importants progrès dans la compréhension des mécanismes biochimiques impliqués dans la régulation et la médiation de l'apoptose, la définition de cette dernière demeure aujourd'hui encore morphologique. Pleinement développées, les modifications nucléaires et cytoplasmiques, décrites précédemment, peuvent être aisément observées sur coupes tissulaires ou en culture cellulaire par un examen simple en microscopie optique en lumière blanche après réalisation d'une coloration « ordinaire » comme l'hématoxyline éosine safran (coupes tissulaires), ou le May Grunwald Giemsa (cytologie) et ou en fluorescence après coloration de l'ADN (DAPI) (247). La reconnaissance des cellules apoptotiques peut être moins aisée à un stade précoce du processus de mort cellulaire, lorsque les plans de coupe ne sont pas optimaux et après fixation tissulaire imparfaite. Ces difficultés d'analyse sont tout particulièrement rencontrées dans les populations de cellules dont les noyaux sont, à l'état physiologique, condensés comme les lymphocytes non activés et les oligodendrocytes (247). Les altérations morphologiques sont plus aisément et spécifiquement reconnues lorsque l'examen est réalisé en microscopie électronique. Cette dernière méthode est chronophage, coûteuse et nécessite l'examen d'un très grand nombre d'échantillons pour s'assurer de la représentativité de l'analyse (248).

Les techniques ISEL (« In Situ End-Labeling ») reposent sur l'addition de désoxynucléotides sur les fonctions 3'OH terminales libres à l'aide de l'enzyme transférase terminale (TdT). La composition du milieu réactionnel est choisie de telle sorte qu'un des désoxynucléotides soit porteur d'une molécule traceuse détectable par méthodes immunohisto (cyto) chimiques. Cette méthode porte le nom de TUNEL (« TdT (Terminal déoxynucléodityl Transférase) médiated dUTP-biotin Nick End Labelling ») (249). Il est également possible d'utiliser la DNA polymérase I d'*Escherichia Coli* pour incorporer des désoxynucléotides dont l'un est porteur de la molécule traceuse. Dans cette technique, au niveau des cassures de l'ADN, l'enzyme détruit le DNA par son activité exonucléase qui s'exerce de 5' en 3' et le resynthétise

par son activité polymérase. Cette technique porte le nom d'ISNT (« In Situ Nick Translation ») (250). La sensibilité de ces méthodes est bonne bien que seules les cellules engagées dans la phase finale de l'apoptose soient détectées (250). On peut leur reprocher leur manque de spécificité dû à des faux positifs générés par des ADN très dégradés (autolyse, nécrose) ou des conditions expérimentales mal maîtrisées (249-251). Une amélioration de la spécificité a été apportée par la technique ISOL (« In Situ OligoLigation ») qui utilise l'ADN ligase pour ajouter des oligonucléotides marqués au bout franc de l'extrémité sortante 3' des doubles ou mono brins d'ADN (251).

Les techniques immunohistochimiques reposent sur la détection des formes activées de certaines protéines impliquées dans les voies de transduction dans l'apoptose caspase-dépendante. Les antigènes les plus recherchés sont la cytokératine 18 (CK18) clivée (250), et la caspase-3 active (252). La détection de la forme clivée de PARP est peu utilisée (253; 254). CK18 est initialement clivée au niveau du domaine carboxy-terminal, découvrant un nouvel épitope reconnu par l'anticorps M30. Seules les caspases-9, -3 et -7 peuvent générer cet épitope. Dans un deuxième temps CK18 subit un deuxième clivage par caspase-6, elle-même activée par caspase-3 (127). La spécificité et la sensibilité de la technique utilisant l'anticorps M30 est excellente comparée aux autres techniques (254). Cependant cet anticorps ne peut pas être utilisé sur toutes les populations cellulaires, puisque CK18 n'est pas exprimée dans tous les tissus (255). L'utilisation d'un anticorps spécifique de la forme active de la caspase-3 a permis d'améliorer la détection des cellules apoptotiques (252). L'anticorps reconnaît le fragment large 17-20 kDa de la caspase-3 clivée en se fixant sur un néo-épitope généré par le clivage après Asp175 (254). Cette méthode donne de bons résultats comparés aux autres marqueurs de l'apoptose (255).

L'évaluation de l'apoptose suite au traitement de tumeurs par Foscan®-PDT est peu documentée (voir tableau 5). L'évolution des techniques de marquage de l'apoptose sur tissus, en particulier grâce au développement d'anticorps spécifiques permettant de mettre en évidence les événements moléculaires impliqués dans les différentes voies de signalisation, ouvre des perspectives intéressantes.

OBJECTIFS

Notre travail s'inscrit dans la continuité des efforts entrepris par notre équipe pour optimiser les modalités d'application de la PDT utilisant le Foscan®. Notre réflexion sur les mécanismes de mort cellulaire programmés par la cellule suite à la photosensibilisation avec le Foscan® est née d'une part des avancées apportées par de précédents travaux sur la localisation intracellulaire du Foscan® et d'autre part du peu de données dans la littérature concernant les événements moléculaires photoinduits avec le Foscan® pouvant conduire à l'apoptose. En effet, la relation entre sites de localisation, dommages photoinduits et voies moléculaires de l'apoptose s'est vite imposée à nous comme une hypothèse des plus plausibles que nous avons voulu étayer *in vitro* mais également *in vivo* grâce à une approche visant à évaluer des marqueurs susceptibles de nous apporter les informations nécessaires à une meilleure orientation du traitement vers l'apoptose photoinduite avec le Foscan®.

La première étude *in vitro*, a été consacrée à trois objectifs :

- (1) Définir le mode de mort cellulaire majoritaire emprunté par la cellule suite à la photosensibilisation par le Foscan®,
- (2) Déterminer les événements mitochondriaux caractéristiques de la voie intrinsèque de l'apoptose,
- (3) Evaluer et moduler l'apoptose photoinduite dans un modèle de micro-tumeur non vascularisée, le sphéroïde, en fonction de l'irradiance et de la fluence appliquée en PDT.

La deuxième étude *in vitro* s'inscrit dans un contexte pro-apoptotique lié à la localisation subcellulaire du Foscan®. Notre démarche a été d'évaluer des événements moléculaires précis suite à l'aggravation du stress oxydant du réticulum endoplasmique due au renforcement de la localisation du Foscan® dans cet organe.

La troisième étude est une approche immunohistochimique des marqueurs de l'apoptose. La finalité de ce travail était de définir l'intérêt que peut présenter trois marqueurs moléculaires, caspase-3, caspase-7 et PARP clivée, dans le contexte de l'apoptose induite par Foscan®-PDT *in vivo*.

L'ensemble de ces travaux figurent dans la partie « RESULTATS » de cette thèse.

RESULTATS

1. CARACTERISTIQUES ET MODULATION DE L'APOPTOSE INDUITE PAR LA THERAPIE PHOTODYNAMIQUE AVEC LE FOSCAN®

1.1. Importance de l'apoptose photoinduite par le Foscan® dans la mort des cellules HT29. Implication de la mitochondrie

La première partie de ces travaux est consacrée à l'évaluation de l'apoptose dans les cellules d'adénocarcinome colique humain HT29 suite au traitement par Foscan®-PDT.

L'apoptose a été déterminée 4h et 24h après l'application croissante de doses de PDT provoquant 60, 91 et 97 % de mortalité cellulaire . Les cellules apoptotiques ont été quantifiées par cytométrie en flux grâce à l'utilisation d'un anticorps anti-PARP clivée. Dans le même temps les cellules marquées par l'iodure de propidium, qui permet de distinguer les cellules nécrotiques sur le critère de la perte d'intégrité de la membrane plasmique, ont été évaluées. Nos résultats montrent que la nécrose augmente fortement avec la dose de lumière, atteignant environ 70 % pour la dose de lumière la plus élevée alors que l'apoptose plafonne à 30 %. Ces résultats indiquent une induction modérée de l'apoptose et une prépondérance de la nécrose après Foscan®-PDT. La localisation subcellulaire préférentielle du Foscan® étant le complexe RE/Golgi (111), il a été présumé que les dommages photoinduits primaires étaient générés à ce niveau et étaient suivis d'une réponse mitochondriale. La cinétique des événements mitochondriaux, libération du cytochrome c concomitante avec la dépolarisation membranaire, est cohérente avec cette hypothèse et montre une implication de la mitochondrie dans la mort cellulaire.

1.2 Modulation de l'apoptose photoinduite dans les sphéroïdes HT29 par l'irradiance

Cette seconde partie est une première tentative pour moduler l'apoptose par un paramètre essentiel de l'efficacité du traitement par Foscan®-PDT, l'irradiance, qui

gouverne l'état d'oxygénation de la tumeur. A cet égard, le sphéroïde est un modèle cellulaire qui a été précédemment employé en particulier dans notre laboratoire pour montrer le maintien de l'oxygénation et l'augmentation de la photocytotoxicité par l'application d'irradiations faibles (30). Dans cette étude, nous avons employé trois irradiances 90, 30, et 10 mW/cm². Seule l'irradiance 10 mW/cm² produit une photocytotoxicité supérieure à 60 %, ce qui peut être expliquée par une extension de la production d'oxygène singulet aux régions centrales du sphéroïde. A cette irradiance, une activation de la caspase-3 a été trouvée pour une fluence induisant 60 % de mort cellulaire. Pour la même photocytotoxicité, les irradiances supérieures ne produisent pas d'activation de caspase-3. Ces résultats indiquent que les protocoles de traitement utilisant des irradiances faibles permettant de maintenir une oxygénation suffisante des tumeurs favorisent la mort par apoptose.

L'ensemble de ces résultats sont présentés dans les pages suivantes sous forme d'article : S. Marchal et al, 2005, *Biochem Pharmacol* Vol 69, p 1167-76.

Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan[®] photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids

Sophie Marchal, Anas Fadloun, Estelle Maugain,
Marie-Ange D'Hallewin, François Guillemain,
Lina Bezdetnaya*

Centre Alexis Vautrin, CRAN CNRS UMR 7039, 54511 Vandœuvre les Nancy, France

Received 20 August 2004; accepted 24 January 2005

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is an approved anticancer treatment modality that eliminates unwanted cells by the photochemical generation of reactive oxygen species following absorption of visible light by a photosensitizer, which is selectively taken up by tumor cells. Present study reports the modalities of cell death after photosensitization of human adenocarcinoma HT29 monolayer and spheroid cells with a second generation photosensitizer Foscan[®]. Kinetics of apoptosis and necrosis after Foscan[®]-PDT in monolayer cells determined by flow cytometry using labeling of cleaved poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) and staining with propidium iodide (PI) demonstrated that Foscan[®] was not a strong inducer of apoptosis and necrosis was a prevailing mode of cell death. Cytochrome *c* release (cyt *c*) and mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) addressed by flow cytometry technique at different time points post-Foscan[®]-PDT demonstrated that cell photoinactivation was governed by these mitochondrial events. Foscan[®]-loaded HT29 multicell spheroids, subjected to irradiation with different fluence rates and equivalent light doses, displayed much better tumoricidal activity at the lowest fluence rate used. Apoptosis, measured by caspase-3 activation was evidenced only in spheroids irradiated with the lowest fluence rate and moderate fluence inducing 65% of cell death. Application of higher fluence rates for the same level of photocytotoxicity did not result in caspase-3 activation. The observation of the fluence rate-dependent modulation of caspase-3 activity in spheroids offers the possibility of regulating the mechanism of direct cell photodamage and could be of great potential in the clinical context.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: Photodynamic therapy; Foscan[®]; Apoptosis; Mitochondrial events; Caspase-3; Spheroids

1. Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is a promising therapeutic strategy for the treatment of superficial, in situ and micro-invasive tumors. PDT is based on the administration of tumor-localizing chemicals (photosensitizers) with consecutive non-ionizing illumination of the tumor. PDT induces localized tumor destruction via the photochemical generation of cytotoxic singlet oxygen ($^1O_2$) or other reactive oxygen species. Two principal mechanisms should be

considered in PDT-mediated tumor eradication: direct damage of tumor cells and stroma leading to apoptosis and/or necrosis and an indirect pathway, which consist in microvascular injury and non-specific immune activation [1,2].

A second generation photosensitizer Foscan[®] (meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC)), which displays improved chemical and photophysical properties over Photofrin[®] (Porfimer sodium), was reported to be mainly localized in the membranes of endoplasmic reticulum (ER) and Golgi [3]. It mediates cell photodamage, principally through singlet oxygen formation [4], and its tumoricidal effect appears to be very sensitive to oxygenation conditions [5,6]. Foscan[®] has been granted European approval for palliative treatment of patients with

Abbreviations: cyt *c*, cytochrome *c*; ER, endoplasmic reticulum; LD, lethal dose; $\Delta\psi_m$, mitochondrial membrane potential; PARP, poly(ADP-ribose) polymerase; PDT, photodynamic therapy; PI, propidium iodide.

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 59 83 06; fax: +33 3 83 59 83 78.
E-mail address: l.bolotne@nancy.fncec.fr (L. Bezdetnaya).

advanced head and neck cancers who have exhausted all standard treatment options. Recent clinical open-label multicenter studies also reported the efficacy of Foscan[®]-PDT in the treatment of early squamous cell carcinoma [7,8].

PDT-induced apoptotic response in cultured cells is characterized by the rapid release of mitochondrial cyt *c* into the cytosol with the consecutive cascade of caspases activation, in particular caspase-3, which is a key-element in apoptotic cell death [1,9,10]. PDT-induced apoptosis culminates in chromatin condensation as early as 1–2 h after irradiation [11–15]. Quite frequently, apoptosis and necrosis can be activated simultaneously, the prevailing mechanism of cell death being determined by dosing conditions, cell line, oxygen availability, etc. Therefore, an unfolding and dissection of cell death pathways following photosensitization is worth of interest and should be established for every given photosensitizer.

In many circumstances cells are committed to die before the execution phase of apoptosis starts and this commitment event is coordinated by mitochondria [16,17]. Several studies have suggested the release of mitochondria cyt *c* as a point of no return in photoinduced cell damage [14,16]. Recently, we documented fluence-dependent cyt *c* release immediately after Foscan[®]-PDT in HT29 cultured cells [18]. A possible approach to elucidate whether cyt *c* release could be a critical lethal event in Foscan[®]-mediated cell death consists in the detailed post-PDT kinetics of mitochondria alterations.

The ability to manipulate the cell fate machinery is an obvious goal, if a certain type of cell death is required in the clinical context. The rate of light delivery (fluence rate) could be one of the parameters, which allows a modulation of photooxidative substrate damage through the control of tumor oxygenation. The reduction of photodynamic oxygen consumption by using low fluence rates of irradiation clearly improves the Foscan[®]-PDT treatment outcome in vivo [6,19] and in vitro in multicell tumor spheroids, which serve as an excellent model of small avascular tumors [5]. Similar observations have been reported in spheroids with Photofrin[®] [20] and ALA-based PDT [21]. Recently, Henderson et al. [22] have shown that the levels of PDT-induced apoptosis using pheophorbide-a derivative were dependent on the fluence rate applied in allografted tumors.

The present study addresses the kinetics of cytochrome *c* release, mitochondrial membrane depolarization and appearance of apoptotic and necrotic cell fractions in HT29 human colon adenocarcinoma cells after Foscan[®]-PDT with respect to the different levels of cell death. We further assessed apoptosis induction in HT29 tri-dimensional aggregates by measuring activity of caspase-3. The possibility of fluence rate-dependent modulation of the activity of caspase-3 in spheroids was also investigated.

2. Materials and methods

2.1. Monolayer cell culture

HT29 human adenocarcinoma cells were obtained from ATCC cell collection and regularly controlled for mycoplasma contamination. Cells were maintained in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Life Technologies) supplemented with 10% heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (Costar), 1% penicillin (10,000 IU), streptomycin (10,000 µg/ml) and 1% 200 mM glutamine (Life Technologies). Cells were kept at 37 °C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, trypsinized and re-seeded into fresh medium every 7 days. Four days before treatment, 3×10^4 cells/ml were seeded in 60 mm diameter Petri dishes.

2.2. Spheroid cell culture

Multicell spheroids were initiated by seeding 5×10^4 single HT29 cells into 75 cm² flasks, previously coated with 1% L-agarose. After 3 days, aggregates were transferred to 250 ml spinner flasks (Integra Biosciences) containing 150 ml of culture medium. The flasks were placed on magnetic plates (Integra Biosciences) at 75 rpm in 5% CO₂ and 37 °C humidified atmosphere. Five days after seeding, aggregates were filtered through 100 and 150 µm sterile nylon screen (VWR International) in order to obtain a homogeneous population of 100–150 µm in diameter. Spheroid culture medium was changed every 2–3 days. When spheroids reached 500 µm in diameter after 15 days culture, they were used for experiments.

2.3. Photosensitizer

Foscan[®] (mTHPC) was kindly supplied by Biolitec Pharma Ltd. Foscan[®] stock solution was prepared in methanol. Further dilution was performed in phenol red free RPMI 1640 medium supplemented with 2% fetal calf serum to reach final Foscan[®] concentrations of 1.45×10^{-6} M and 4.5×10^{-6} M for monolayer and spheroid cultures, respectively.

2.4. Photodynamic treatment of monolayer cells

Logarithmically growing HT29 cells were incubated with 1 µg/ml (1.45×10^{-6} M) Foscan[®] solution in RPMI supplemented with 2% FCS for 3 h. After two consecutive washings, fresh medium was added and cells were irradiated with a 650 nm laser diode at fluences ranging from 0.06 to 1.92 J cm⁻² at a fluence rate of 4.5 mW cm⁻². Cells were immediately harvested by trypsinization, 4 and 24 h after PDT, for measurements of mitochondrial membrane alterations, apoptotic and necrotic cell number. To assess the effect of the caspase inhibitor zVAD-FMK on

apoptosis and necrosis, a 10^{-2} M stock solution of zVAD-FMK (BD Biosciences) in DMSO was added to cells by dilution 1:500 with cell medium to reach final zVAD-FMK concentration of 2×10^{-5} M. zVAD-FMK solution was added to cells immediately before irradiation and maintained with cells until analysis. Control cells were incubated with Foscan[®], with or without zVAD-FMK, and were not subjected to irradiation (drug, no light).

2.5. Photodynamic treatment of spheroid cells

Eighty HT29 spheroids of 500 μ m diameter were transferred from the spinner flask to 35 mm Petri dishes. Incubation with 3 ml of complete medium containing 4.5×10^{-6} M of Foscan[®] was performed at 37 °C, in the dark, for 24 h. After three washes with PBS, spheroids were transferred into 60 mm Petri dishes containing 3 ml culture medium and subjected to irradiation. Irradiations were carried out at 650 nm with a laser diode with various fluences administered at fluence rates of 10, 30 and 90 mW cm⁻². The irradiation times were adapted for each fluence rate so that equivalent fluences of 1, 5, 10, 15 and 30 J cm⁻² were delivered. Control spheroids were exposed to Foscan[®] and not irradiated (drug, no light).

2.6. Cell survival assays

Cells were collected from the monolayer or from spheroids with trypsin immediately after PDT. They were counted with a Thoma hemocytometer by using trypan blue exclusion assay in order to determine cell yield following PDT treatment. Intact cells were seeded in triplicate into 6-well plates for plating efficiency according to a technique previously described [23]. Briefly, a layer consisting of 1 ml of 0.5% molten agar (Bacto agar, Difco) in culture medium was poured in each well. Over this bottom layer, 10^3 cells were plated in 1 ml culture medium containing 0.3% agar. Cultures were incubated at 37 °C with 5% CO₂ in air for 14 days. Colonies composed of more than 50 cells were counted with an automatic image analysis program (AnalySiS 3.1). The cell yields and the plating efficiencies of each experimental group were normalized to those obtained from control groups (light, no drug), and the overall surviving fraction was determined by computing the product of these two results.

2.7. Apoptosis and necrotic cell fractions assessed by flow cytometry

PARP cleavage is the prominent feature of apoptosis [24]. During apoptosis, PARP is cleaved from its 116 kDa intact form to 85 and 25 kDa fragments. Apoptotic cells were measured by labeling of cleaved PARP with a mouse anti-human monoclonal antibody, which recognizes only the 85 kDa cleaved form of PARP. According to manu-

facture recommendations (BD Biosciences), 10^5 to 5×10^5 cells were collected after trypsinization, washed with PBS containing 1% FCS and fixed with 250 μ l cytofix/cytoperm solution (BD Biosciences) for 20 min at 4 °C. After washing by Perm/Wash solution (BD Biosciences), 0.25 μ g monoclonal antibody in 50 μ l Perm/Wash solution were added to cells for 30 min at 4 °C. Cells were then washed by Perm/Wash solution and labeled with 5 μ l fluorescence isothiocyanate (FITC) conjugated goat anti-mouse polyclonal antibody (DakoCytomation) in 50 μ l Perm/Wash solution for 30 min at 4 °C. After washing, cells in 500 μ l Perm/Wash solution were analyzed by flow cytometry. The FITC fluorescence (λ_{ex} = 488 nm, λ_{em} = 519 nm) was detected in fluorescence channel FL1 with a 530 ± 30 nm band pass filter. Necrotic cells were assessed by flow cytometry after labeling 10^5 cells with 0.03 μ M propidium iodide (PI) for 15 min.

2.8. Western blot analysis of PARP

HT29 monolayer cells, treated with light doses of 0.26, 0.64 and 1.92 J cm⁻², were collected by scraping 24 h after treatment, washed in ice-cold PBS and treated with lysis buffer, containing 10 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1% triton X-100, 1 mM EDTA and 0.1 M phenylmethanesulfonyl fluoride (PMSF) for 30 min on ice and further centrifuged at $15,000 \times g$ for 20 min. Protein samples (50 μ g) were heated to 95 °C for 7 min in the presence of 5% 2-mercaptoethanol, chilled on ice and subjected to SDS-PAGE analysis, followed by electrophoretic transfer to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes. Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk in PBS and 0.5% Tween-20 for 1 h at room temperature and afterwards were incubated overnight at 4 °C with purified mouse anti-cleaved PARP (Asp 214) monoclonal antibody (1:2000). After several washes the blots were incubated with secondary anti-mouse IgG linked to horseradish peroxidase (1:1000). The antigens were detected using the ECL detection system (Amersham Biosciences) and visualized by autoradiography.

2.9. Measurements of the mitochondrial membrane depolarization

The green fluorescent probe 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide, JC-1 (Molecular Probes) exists as a monomer at low membrane potential and at higher potentials, JC-1 forms red fluorescent aggregates. The use of this probe in the measurement of $\Delta\psi_m$ after PDT has been described previously [25]. Trypsinized cells (5×10^5 cells) were centrifuged at $400 \times g$. Cell pellet was suspended in 1 ml medium containing 1 μ l of JC-1 (final concentration 5 μ g/ml). After a 15 min incubation at 37 °C, cell suspension was measured by flow cytometry (FACSCalibur). The aggregate fluorescence (λ_{ex} = 488 nm,

$\lambda_{em} = 590$ nm), detected in fluorescence channel FL2 with a 585 ± 42 nm band pass filter can easily be separated from the monomer fluorescence ($\lambda_{ex} = 488$ nm, $\lambda_{em} = 527$ nm) detected in fluorescence channel FL1 with a 530 ± 30 nm band pass filter.

2.10. Measurements of cytochrome *c* release

Cytochrome *c* release was estimated by labeling digitonin-permeabilized cells with APO2.7 phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibody (Beckman Coulter) [26]. Trypsinized $(0.5\text{--}1) \times 10^6$ cells were permeabilized with $0.1 \mu\text{g/ml}$ digitonin for 20 min at 4°C , washed and labeled with PE-APO2.7 (dilution 1/5) for 15 min at room temperature. After washing, cells were measured by flow cytometry using excitation at 488 nm and fluorescence emission at 585 ± 42 nm (FL2).

2.11. Quantification of caspase-3 activity in spheroids

For each experimental point, cells obtained from 80 spheroids and 24 h after treatment were washed with PBS, and the pellet obtained after centrifugation was stored at -20°C until use. Spheroids were dissociated in 1 ml lysis buffer composed with 10% sucrose, 20 mM Hepes, 0.1% chaps, 2 mM dithiothreitol, 1 mM EDTA, $1 \mu\text{g/ml}$ pepstatin, $1 \mu\text{g/ml}$ leupeptin and $100 \mu\text{g/ml}$ phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), pH 7.4. The cell lysate was incubated on ice for 30 min, sonicated twice for 10 s and centrifuged (10 min, $10,000 \times g$). $800 \mu\text{l}$ of supernatant were incubated with $200 \mu\text{l}$ (6×10^{-6} M) highly specific caspase-3 fluorogenic substrate DEVD-AFC (Asp-Glu-Val-Asp, DEVD conjugated with 7-amino-4-trifluoromethylcoumarin, AFC) (BD Biosciences) in lysis buffer at 37°C for 1 h. The specificity of caspase-3 activity was verified by adding 0.05×10^{-6} M DEVD-CHO for 2 h. In all cases, a complete inhibition of the enzymatic reaction was obtained. The released fluorescent product was measured spectrofluorimetrically ($\lambda_{ex/em}$ 400 nm/450–550 nm; Perkin-Elmer L2259051). The raw data were normalized per mg protein. Protein concentrations were estimated in cell lysates by using the Bio-Rad assay. The final results were expressed as the ratio between the experimental and the control normalized values.

2.12. Imaging of Foscan[®] distribution in HT29 spheroids

Spheroids incubated with 4.5×10^{-6} M of Foscan[®] during 24 h in the dark were placed in a freezing medium (Jung, Leica), frozen at -25°C and sectioned into $6 \mu\text{m}$ microscope slides using a cryostat (Leica CM1850). Preparations were mounted with an aqueous medium (Menzel superfrost color). Spheroid sections were then observed under a fluorescence microscope (Leica DMRB). Excitation filter: band pass 450–490 nm.

2.13. Statistical analysis

Mann-Whitney's *U* test was employed to determine the statistical significance with a limit set to $p < 0.05$ using Stavius 5.0 software.

3. Results

3.1. Cell viability in HT29 monolayer cultured cells photosensitized with Foscan[®]

Loss of cell viability of HT29 cells subjected to Foscan[®]-based PDT was assessed by clonogenic assay after irradiation with a range of light fluences (Fig. 1). Fluences of 0.26, 0.64 and 1.92 J cm^{-2} were chosen for further examination of mitochondrial alterations and modalities of cell death. The corresponding loss of viability was 60, 91 and 97%.

3.2. Apoptotic and necrotic cell death after photosensitization with Foscan[®]

Modalities of cell death imposed on HT29 cells by Foscan[®]-PDT were approached by flow cytometry quantification of apoptotic and necrotic cells. Number of apoptotic cells was deduced from the specific labeling of 85 kDa fragment of cleaved PARP. PARP cleavage was confirmed by immunoblotting at 24 h post-PDT. Necrotic cells were measured with a high-affinity nucleic acid probe PI that easily penetrates cells with compromised plasma membranes and does not cross the membranes of living cells.

Fig. 2a and b presents the evolution of apoptotic response at different post-PDT intervals in HT29 cells subjected to LD₉₇. Shortly after PDT (4 h), the percentage of fluorescent cells significantly augmented in M1 gate

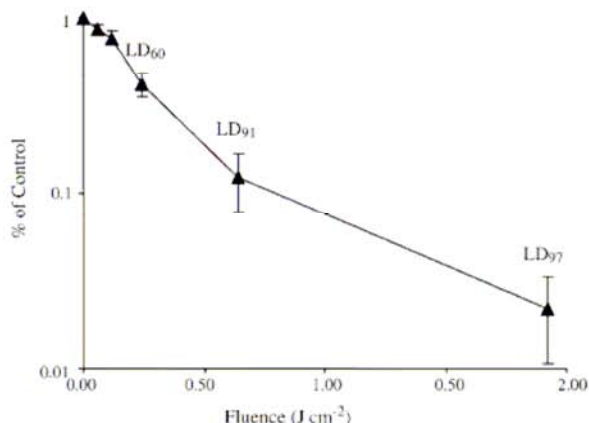


Fig. 1. Dose dependence of cell killing in HT29 cells sensitized with Foscan[®] (1.45×10^{-6} M, 3 h). The percentage of cell survival was counted by clonogenic assay 15 days after PDT. Results are the mean $\pm$ S.E.M. of at least three independent experiments.

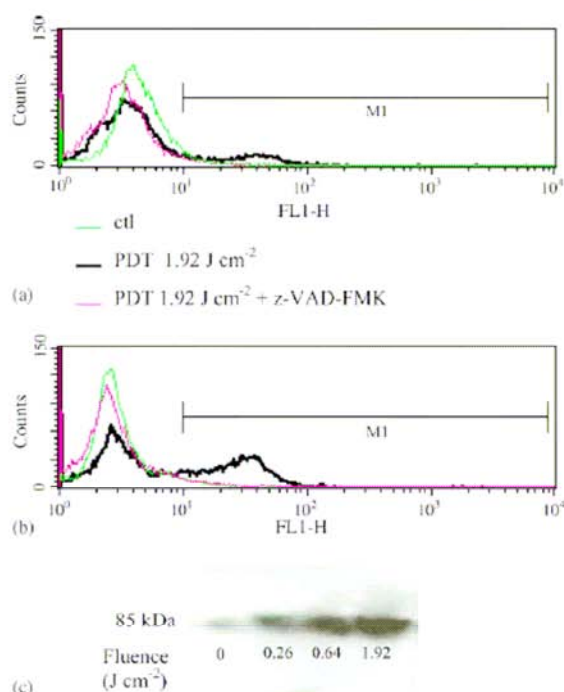


Fig. 2. The effect of Foscan® photosensitization on PARP cleavage in HT29 cells assessed by flow cytometry (a, b) and by Western blotting (c). (a, b) Cells were exposed to $1.45 \times 10^{-6} \text{ M}$ Foscan® for 3 h, irradiated at 1.92 J cm^{-2} (LD_{97}) with red light ($\lambda = 652 \text{ nm}$), labeled with anti-cleaved PARP mouse monoclonal antibody and a FITC-labeled secondary anti-mouse antibody. Histograms of log scale green FITC fluorescence (x-axis, FL1-H) as a function of cell counts (a) 4 h and (b) 24 h after PDT. (c) Cells were exposed to $1.45 \times 10^{-6} \text{ M}$ Foscan® for 3 h, irradiated at 0.26, 0.64 and 1.92 J cm^{-2} with red light ($\lambda = 652 \text{ nm}$) and 24 h later analyzed by Western blotting with monoclonal mouse antibody to cleaved PARP.

compared to control cells (drug, no light) (Fig. 2a). At 24 h post-PDT about 35% cells underwent PARP cleavage (Fig. 2b). Apoptosis was inhibited to the level of untreated cells when irradiation was performed in the presence of caspase inhibitor z-VAD-FMK (Fig. 2a and b).

PARP cleavage at 24 h after irradiation at three light doses was further confirmed by Western blotting (Fig. 2c). With the increase in the light doses, a progressive increase in the expression level of 85 kDa cleaved band was detected.

Fig. 3 displays the kinetics of accumulation of apoptotic and necrotic cells with and without z-VAD-FMK with respect to the applied fluences. A sharp increase in the number of apoptotic cells was observed at 4 h post-PDT with the highest fluence, while two lower fluences did not differ significantly from control values (Fig. 3a). A maximum of apoptotic cells ($35.4 \pm 6.8\%$) was registered 24 h post-PDT with the highest fluence, and this value was not significantly different ($p = 0.27$) from that at the fluence of LD_{91} ($28.4 \pm 5.6\%$). A slight but still statistically significant increase in apoptosis over control treatment was registered 24 h post-PDT for cells irradiated with LD_{60} .

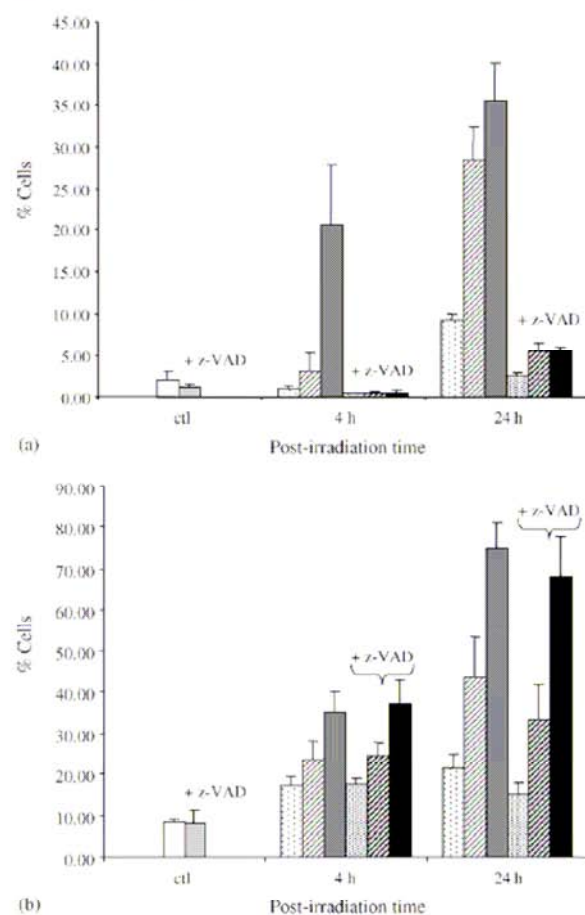


Fig. 3. Kinetics of post-PDT accumulation of apoptotic (a) and necrotic (b) HT29 cells in response to sensitization with Foscan® ($1.45 \times 10^{-6} \text{ M}$, 3 h). Cells were irradiated at 0.26 J cm^{-2} in the absence (□) or in the presence (▨) of z-VAD-FMK; at 0.64 J cm^{-2} in the absence (▤) or in the presence (▥) of z-VAD-FMK and at 1.92 J cm^{-2} in the absence (■) or in the presence (■) of z-VAD-FMK. Control cells (light, no drug) without (□) or with (▣) z-VAD-FMK. Results are the mean of at least three independent experiments.

Decrease in apoptotic cells to the levels of untreated controls was registered in the presence of z-VAD-FMK at all applied fluences and both post-PDT time points (Fig. 3a).

Necrosis augmented with time post-PDT and increasing light doses (Fig. 3b). Irradiation with high light fluences (LD_{91} and LD_{97}) resulted in a steady increase in necrotic fractions with time after treatment with an accumulation of, respectively, $43.60 \pm 16.8\%$ and $74.9 \pm 11.0\%$ PI positive cells at 24 h post-PDT. Cells subjected to irradiation with the lowest dose (LD_{60}) exhibited different kinetic profile with a slow increase in necrotic cell fraction reaching $21.6 \pm 5.6\%$ at 24 h after treatment (Fig. 3b). Presence of z-VAD-FMK during and after irradiation did not significantly affect PDT-mediated necrosis, irrespective of light fluences and times post-PDT.

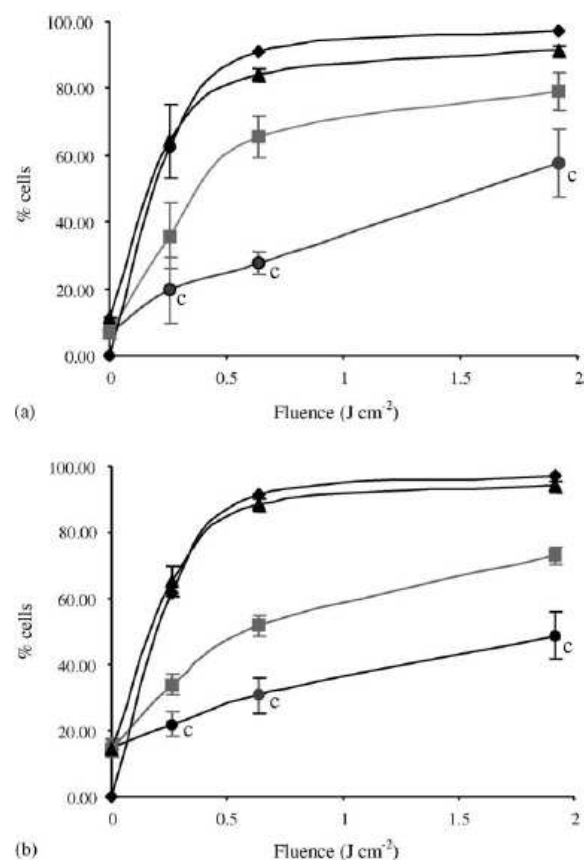


Fig. 4. Fluence-related (a) cytochrome *c* release and (b) mitochondrial membrane depolarization in Foscan[®]-photosensitized HT29 adherent cells. Data on the loss of clonogenicity (◆) are taken from Fig. 1. Cells were analyzed 4 h (■) and 24 h (▲) after irradiation. The letter 'c' indicates data from Marchal et al. [18]. Results are the mean $\pm$ S.E.M. of at least three independent experiments.

3.3. Photoinduced cytochrome *c* release and mitochondrial membrane depolarization in monolayer HT29 cells

The fluence-dependent cyt *c* release and alterations of $\Delta\psi_m$ at 4 and 24 h after Foscan[®] photosensitization are displayed in Fig. 4a and b and our previous data on mitochondrial membrane damage, tested immediately after PDT [18] are included for comparison. In contrast to the loss of mitochondrial membrane functions immediately after PDT, at 4 h post-PDT the profile of cyt *c* release paralleled that of the loss of cell viability with a noticeable similarity 24 h post-PDT (Fig. 4a). At this time point, the percentage of cells with cyt *c* release matched perfectly the percentage of dead cells observed at every applied fluence (64, 84 and 92% versus 60, 91 and 97%).

The loss of $\Delta\psi_m$ demonstrated the same kinetic pattern as that of cyt *c* release (Fig. 4b), except for a slight difference at 4 h post-PDT, thus suggesting that both

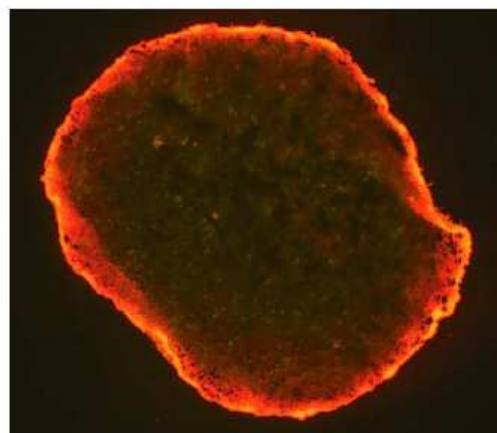


Fig. 5. Fluorescence photomicrograph of a typical 6 μ m thick frozen section from the Foscan[®]-sensitized HT29 spheroid of 500 μ m in diameter.

photoinduced cyt *c* release and mitochondrial membrane depolarization are concomitant and correlated events.

3.4. Foscan[®] distribution in HT29 multicell tumor spheroids

The Foscan[®] distribution in spheroid is presented in Fig. 5. A strong pattern of the dye fluorescence, observed in the outer rim of the spheroid, falls off quickly from the spheroid surface and represents a weak constant fluorescence in the spheroid center.

3.5. Effects of fluence rates of irradiation on Foscan[®]-photosensitized HT29 spheroids

Foscan[®]-loaded spheroids were irradiated with a range of light fluences delivered at three different fluence rates of 10, 30 and 90 mW cm⁻². As the fluence rate was reduced from 90 to 10 mW cm⁻², the overall survival was dramatically diminished for equivalent doses of light (Fig. 6). For example, for the fluence of 10 J cm⁻², the percentage of viable cells was 71, 49 and 4% in response to the fluence rates of 90, 30 and 10 mW cm⁻².

3.6. Evaluation of caspase-3 activation in HT29 spheroids

Caspase-3 activation after photodynamic treatment of spheroids was employed as a measure of apoptosis. Table 1 presents the results of caspase-3 activation and photocytotoxicity after illumination with the fluence rate of 10 mW cm⁻² at three different fluences (1, 5 and 10 J cm⁻²) corresponding to LD₁₇, LD₆₅ and LD₉₆. At LD₁₇ and LD₉₆ caspase-3 activity was not significantly different from control cells. In contrast, caspase-3 activation at LD₆₅ was 2.6-fold above the level of untreated cells ($p = 0.021$).

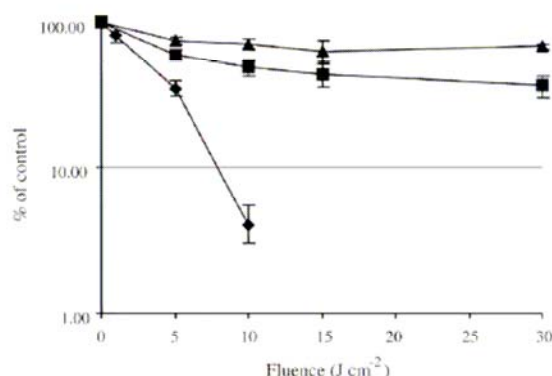


Fig. 6. Dose dependence of overall survival of cells dissociated from Foscan[®]-sensitized HT29 spheroids (4.5×10^{-6} M, 24 h) treated with PDT delivered at fluence rates of 10 mW cm^{-2} (♦), 30 mW cm^{-2} (■) or 90 mW cm^{-2} (▲). The percentage of cell survival was counted by clonogenic assay 15 days after PDT. Results are the mean $\pm$ S.E.M. of at least three independent experiments.

Table 1
Caspase-3 induction 24 h post-PDT in Foscan[®]-sensitized HT29 spheroids (4.5×10^{-6} M, 24 h) irradiated at the fluence rate of 10 mW cm^{-2} with different light fluences

Fluence (J cm^{-2})	Photocytotoxicity % of control	Caspase-3 fold induction	Statistics (<i>p</i>)
1	17	1.40 ± 0.89	0.25
5	65	2.62 ± 1.07	0.021*
10	96	1.42 ± 0.36	0.064

* Statistically significant value given by the Mann-Whitney's *U* test (*p* < 0.05).

We further compared the induction of apoptosis in spheroids treated with three fluence rates and light doses inducing a photocytotoxicity of 65%. Caspase-3 activation at 30 and 90 mW cm^{-2} was, respectively, 1.17 ± 0.06 and 1.12 ± 0.24 fold induction and did not significantly differ from the control values. Thus, among all fluence rates used, only the fluence rate of 10 mW cm^{-2} resulted in a significant caspase-3 induction for a given level of photocytotoxicity of 65%.

4. Discussion

The modalities of cell death provided by photodynamic treatment are still under investigation and the complexity of a network of survival and death pathways has been recently reviewed by Agostinis et al. [27].

Apoptosis has been found to be a prominent form of cell death in many cells after photosensitization. The pathways in which apoptotic cells are engaged after PDT, the intensity and the rapidity of the process are mainly dependent on the cell line, the subcellular localization of the photosensitizer and the extent of photooxidative damage [1,2,28–30].

We have chosen to follow apoptosis in Foscan[®]-photosensitized HT29 cells. The number of necrotic and apoptotic cells (Fig. 3a and b) displayed a significant increase with increasing time and light dose. However, the general pattern of necrotic and apoptotic cells' distribution was in favor of necrosis. In particular, at 24 h post-PDT the number of necrotic cells (Fig. 3b) displayed a dramatic increase with increasing light dose ($21 \pm 6\%$, $44 \pm 17\%$ and $75 \pm 11\%$ at LD_{60} , LD_{91} and LD_{97} , respectively), while the number of apoptotic cells increased from $9 \pm 1\%$ to $28 \pm 6\%$ with no further increase at the highest fluence applied ($28 \pm 6\%$ versus $35 \pm 7\%$, *p* = 0.27).

The presence of a broad spectrum caspase inhibitor (z-VAD-FMK) during and after irradiation completely abrogated Foscan[®]-PDT apoptosis upon all treatment conditions (Fig. 3a). At the same time, no significant difference was observed for necrosis (Fig. 3b). Together with our previous observation on caspase-3 activation in HT29 cells subjected to Foscan[®]-PDT [18], the present one points out to caspase-dependent nature of apoptotic process mediated by Foscan[®] photosensitization. Further, the lack of inhibitory effect of z-VAD-FMK on necrotic cells presumes that necrosis is directly induced by photodamage rather than being secondary to apoptosis.

Taken as a whole, the mild level of post-PDT apoptosis observed in the present study is likely to be related to the specificity of Foscan[®] localization. The preferential Foscan[®] localization in the Golgi/reticulum complex was microscopically observed in human and murine mammary malignant cells [3,31]. In all likelihood this localization pattern could be extended to HT29 cells, as can be deduced from primarily photodamaged Golgi apparatus after Foscan[®]-PDT in HT29 cultured cells [32]. Thus, the Golgi/reticulum complex could be a site from which the cell death signals originate and converge on mitochondria to trigger the apoptotic process in a less efficient manner than mitochondria-targeting photosensitizers. Similar observation was reported for other reticulum/Golgi localizing photosensitizers [29,33].

Mitochondria play a key role in the pathways of cell death either by mitochondrial proteins involved in the apoptotic process or by the loss of functionality resulting in ATP depletion [34]. It has been suggested that in response to different stimuli, including photooxidative stress, the cell may be irreversibly committed to death once mitochondrial cyt *c* is released into the cytosol [16,17,35,36]. The proposal on the critical role of cyt *c* in the PDT damage was based on the observation that photoinduced release of cyt *c* proceeds normally in cells irrespective of the functional activity of caspases [16]. Another argument was the good correlation in dose-response between the fraction of cells that release cyt *c* shortly (30 min) after PDT with mitochondria localized photosensitizer phthalocyanine (Pc) 4 and overall survival [14]. Considering ER/Golgi localization of Foscan[®], a certain delay was anticipated for the complete release of

cyt *c* from photokilled cells. Therefore, we studied a detailed post-PDT kinetics of mitochondrial alterations (Fig. 4a and b). Although immediately after irradiation, the kinetic of the loss of mitochondrial membrane functions was very different from that of cell viability, the situation changed from 4 h post-PDT. This early time point evidenced a very good correlation between mitochondrial membrane damage and cell photokilling at each PDT dose. Twenty-four hours post-Foscan®-PDT, the percentage of cells undergoing $\Delta\psi_m$ dissipation and cyt *c* release matched perfectly the percentage of dead cells. This kinetic study clearly shows that both apoptotic and necrotic pathways implicated in Foscan®-mediated HT29 cell photoinactivation are governed by mitochondrial membrane photodamage, thus suggesting the cyt *c* release and mitochondrial membrane depolarization as the critical lethal events for Foscan® photosensitization. However, we cannot discard the possibility that the lethal event, which commits the cells to death lie upstream mitochondria. Such possibility was proposed in the recent study of Chiu et al. [37], where the authors reported the same level of Pc-4 photocytotoxicity whether or not cyt *c* was released after irradiation. Considering a high affinity of Foscan® for ER/Golgi complex, the effects of Foscan®-PDT on the ER proteins, which could be critical for cell death, deserve further investigation.

Another observation from the plots displayed on Fig. 4 is that the both cyt *c* release and $\Delta\psi_m$ dissipation are concomitant events. Contradictory results have been obtained regarding the timing of these both mitochondrial events. Photoinduced cyt *c* release from the mitochondrial intermembrane space to the cytosol simultaneously with the loss of $\Delta\psi_m$ was reported for porphycenes in leukemia cells and for mTHPC in adherent and myeloid cells [11,15,35]. In contrast, other studies separated the dissipation of $\Delta\psi_m$ and cyt *c* release, as has been demonstrated for Pc-4, Hypericin- and chlorin-type photosensitizer [25,38,39].

The comprehension of cell death mechanisms *in vivo* is always a challenge, since apoptotic/necrotic events can arise from the vascular tumor network as well as from direct photodamage of tumor cells. In this context, the three-dimensional arrangements of tumor cells in spheroids provides biochemical and histological similarities to small avascular tumors *in vivo* and allows the specific study of direct photocytotoxic effects of PDT.

The efficacy of Foscan®-based PDT has been related to the maintenance of tumor oxygenation. As illustrated in Fig. 6, therapeutic efficacy increased progressively when the fluence rate was reduced over the range of 90 to 10 mW cm⁻². Even high light doses delivered at fluence rates of 90 and 30 mW cm⁻² were unable to produce more than 60% cell death. This loss in efficacy could be attributed to a protective effect from Foscan®-mediated photochemical reaction in spheroids due to the photochemical oxygen depletion at high fluence rates. Conversely, an

enhanced photocytotoxic effect observed at 10 mW cm⁻² could be explained by the extension of the singlet oxygen dose into the central regions of the spheroid [5]. Following these observations, we evaluated apoptosis by measuring caspase-3 activity in Foscan®-photosensitized spheroids at different levels of cell death and at the efficient fluence rate of 10 mW cm⁻². Among all fluences tested, only at the light dose inducing 65% cell death, we observed statistically significant activation of caspase-3 (2.62-fold induction, $p = 0.021$) (Table 1). Adherent HT29 cells subjected to the same level of photodamage (LD₆₀) were characterized by a 12-fold increase in caspase-3 activation 24 h after Foscan® photosensitization [18]. The considerably lower level of caspase-3 induction in HT29 three-dimensional arrangements contrary to monolayer cells could be related to the fact that cells at the core or the periphery of the spheroid do not receive the same dose of photosensitizer and oxygen. Indeed, Foscan® fluorescence distribution in spheroid sections (Fig. 5) demonstrated a non-uniform sensitizer penetration with an intense Foscan® fluorescence in the outermost rim of the spheroid and a considerably reduced dye fluorescence inside the spheroid. Consequently, the response of cells to photosensitization is inhomogeneous with the external cells being the most photosensitive.

An important observation from the spheroid study is that application of higher fluence rates of 30 and 90 mW cm⁻² for the same level of photocytotoxicity of LD₆₅ did not result in caspase-3 activation. This observation offers the possibility of modulating the mechanism of direct cell photodamage and could be helpful in designing future clinical protocols. Oxygen-conserving low fluence rate protocols favoring apoptosis should be recommended when PDT is applied for the curative treatment of *in situ* neoplasia or/and as a palliative de-obstructing treatment modality. In both cases, a rapid shrinking of the tumor mass is expected and apoptosis without accompanying inflammatory reaction and swelling should be favored above complete tumor eradication. On the other hand, when the goal of PDT is to cure an infiltrative tumor that is possibly already micro-spreading beyond the margins of the illumination spot, necrosis with its accompanying inflammatory reaction may be recommended. However, the protocols employing high fluence rates should be finely tuned, since oxygen-depleting regimens may significantly limit treatment outcome.

In conclusion, we have demonstrated a mild apoptotic response following HT29 monolayer cells photosensitization with Foscan® together with a significant increase in necrosis with increasing time and light dose. Both apoptotic and necrotic pathway implicated in Foscan®-mediated HT29 cell photoinactivation are governed by mitochondrial membrane photodamage manifested by cyt *c* release and $\Delta\psi_m$ dissipation. HT29 spheroids treated with Foscan®-PDT at different fluence rates and equivalent light doses evidenced apoptotic induction only at moderate

fluence rate and fluence inducing 65% cell killing. Application of higher fluence rate did not result in caspase-3 activation. Fluence rate modulation of apoptosis in spheroids could contribute to the optimization of clinical protocol.

Acknowledgments

This work was supported by Alexis Vautrin Cancer Center Research Funds, French Ligue Nationale contre le Cancer. We gratefully acknowledge Biotech Pharma Ltd. for providing the Foscan®.

References

- [1] Oleinick N, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci* 2002;1:1–21.
- [2] Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbek M, et al. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:889–905.
- [3] Teiten MH, Bezdetnaya L, Morlière P, Santus R, Guillemin F. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan® localization in cultured tumor cells. *Br J Cancer* 2003;88:146–52.
- [4] Melnikova VO, Bezdetnaya LN, Potapenko AY, Guillemin F. Photodynamic properties of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in human tumor cells. *Radiat Res* 1999;152:428–35.
- [5] Coutier S, Mitra S, Bezdetnaya L, Parache RM, Georgakoudi I, Foster TH, et al. Effects of fluence rate on cell survival and photobleaching in meta-tetra-(hydroxyphenyl)chlorin-photosensitized Colo 26 multicell tumor spheroids. *Photochem Photobiol* 2001;73:297–303.
- [6] Coutier S, Bezdetnaya LN, Guillemin F, Parache RM, Foster TH. Effect of irradiation fluence rate on the efficacy of photodynamic therapy and tumor oxygenation in meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (MTHPC)-sensitized HT29 xenografts in nude mice. *Radiat Res* 2002;158:339–45.
- [7] Hopper C, Niziol C, Sidhu M. The cost-effectiveness of Foscan mediated photodynamic therapy (Foscan-PDT) compared with extensive palliative surgery and palliative chemotherapy for patients with advanced head and neck cancer in the UK. *Oral Oncol* 2004;40:372–82.
- [8] D'Cruz A, Robinson MH, Biel MA. mTHPC-mediated photodynamic therapy in patients with advanced, incurable head and neck cancer: a multicenter study of 128 patients. *Head Neck* 2004;26:232–40.
- [9] Varnes ME, Chiu SM, Xue LY, Oleinick NL. Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cells: translocation of cytochrome *c* causes inhibition of respiration as well as caspase activation. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;255:673–9.
- [10] Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J* 1997;326:1–16.
- [11] Kessel D, Luo Y. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. *Cell Death Differ* 1999;6:28–35.
- [12] He J, Whitacre CM, Xue LY, Berger NA, Oleinick NL. Protease activation and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase: an integral part of apoptosis in response to photodynamic treatment. *Cancer Res* 1998;58:940–6.
- [13] Granville DJ, Jiang H, An MT, Levy JG, McManus BC, Hunt DWC. Overexpression of Bcl-x_L prevents caspase-3-mediated activation of DNA fragmentation factor (DFF) produced by treatment with photodynamic agent BPD-MA. *FEBS Lett* 1998;422:151–4.
- [14] Chiu S, Evans HH, Lam M, Nieminen A, Oleinick NL. Phthalocyanine 4 photodynamic therapy-induced apoptosis of mouse L5178Y-R cells results from a delayed but extensive release of cytochrome *c* from mitochondria. *Cancer Lett* 2001;165:51–8.
- [15] Chen JY, Mak NK, Yow CM, Fung MC, Chiu LC, Leung WN, et al. The binding characteristics and intracellular localization of temoporfin (mTHPC) in myeloid leukemia cells: phototoxicity and mitochondrial damage. *Photochem Photobiol* 2000;72:541–7.
- [16] Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL. Photodynamic therapy-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a role for caspase-3 in the late steps of apoptosis but not for the critical lethal event. *Exp Cell Res* 2001;263:145–55.
- [17] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis. *Science* 1998;281:1309–12.
- [18] Marchal S, Bezdetnaya L, Guillemin F. Modality of cell death induced by Foscan®-based photodynamic treatment in human colon adenocarcinoma cell line HT29. *Biochemistry (Mosc)* 2004;69:45–9.
- [19] Van Geel IP, Opperlaar H, Marijnissen JP, Stewart FA. Influence of fractionation and fluence rate in photodynamic therapy with Photofrin or mTHPC. *Radiat Res* 1996;145:602–9.
- [20] Foster TH, Hartley DF, Nichols MG, Hilf R. Fluence rate effects in photodynamic of multicell tumor spheroids. *Cancer Res* 1993;53:1249–54.
- [21] Madsen SJ, Sun CH, Tromberg BJ, Wallace VP, Hirschberg H. Photodynamic therapy of human glioma spheroids using 5-aminolevulinic acid. *Photochem Photobiol* 2000;67:612–25.
- [22] Henderson BW, Gollnick SO, Snyder JW, Busch TM, Kousis PC, Cheney RT, et al. Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. *Cancer Res* 2004;64:2120–6.
- [23] Merlin JL, Azzi S, Lignon D, Ramacci C, Zeghari N, Guillemin F. MTT assays allow quick and reliable measurement of the response of human tumour cells to photodynamic therapy. *Eur J Cancer* 1992;28A:1452–8.
- [24] Patel T, Gores GJ, Kaufmann SH. The role of proteases during apoptosis. *FASEB* 1996;10:587–97.
- [25] Chiu SM, Oleinick NL. Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome *c* release during apoptosis induced by photodynamic therapy. *Br J Cancer* 2001;84:1099–106.
- [26] Carthy CM, Granville DJ, Jiang H, Levy JG, Rudin CM, Thompson CB, et al. Early release of mitochondrial cytochrome *c* and expression of mitochondrial epitope 7A6 with prophylin-derived photosensitizer: Bcl-2 and Bcl-x_L overexpression do not prevent early mitochondrial events but still depress caspase activity. *Lab Invest* 1999;79:953–65.
- [27] Agostinis P, Buytaert E, Breyssens H, Hendrickx N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci* 2004.
- [28] Vantighem A, Assefa Z, Vandenabeele P, Declercq W, Courtois S, Vandenheede JR, et al. Hypericin-induced photosensitization of HeLa cells leads to apoptosis or necrosis. Involvement of cytochrome *c* and procaspase-3 activation in the mechanism of apoptosis. *FEBS Lett* 1998;440:19–24.
- [29] Piette J, Volanti C, Vantighem A, Matroule JY, Habraken Y, Agostinis P. Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochem Pharmacol* 2003;66:1651–9.
- [30] Dellinger M. Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem Photobiol* 1996;64:182–7.
- [31] Bigelow CE, Conover DL, Foster TH. Confocal fluorescence spectroscopy and anisotropy imaging system. *Opt Lett* 2003;28:695–7.
- [32] Melnikova VO, Bezdetnaya LN, Bour C, Festor E, Gramain MP, Merlin JL, et al. Subcellular localisation of meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin in human tumor cells subjected to photodynamic treatment. *J Photochem Photobiol B* 1999;49:96–103.
- [33] Matroule JY, Carthy CM, Granville DJ, Jolles O, Hunt DWC, Piette J. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by

- pyropheophorbide-a methylester photosensitization. *Oncogene* 2001;20:4070–84.
- [34] Bernardi P, Scorrano L, Colonna R, Petronilli V, Di Lisa F. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* 1999;264:687–701.
- [35] Teiten MH, Marchal S, D'Hallewin MA, Guillemain F, Bezdetnaya L. Primary photodamage sites and mitochondrial events after Foscan photosensitization of MCF-7 human breast cancer cells. *Photochem Photobiol* 2003;78:9–14.
- [36] Morgan J, Oseroff AR. Mitochondria-based photodynamic anti-cancer therapy. *Adv Drug Deliver Rev* 2001;49:71–86.
- [37] Chiu S-M, Xue L-Y, Usuda J, Azizuddin K, Oleinick NL. Bax is essential for mitochondrion-mediated apoptosis but not for cell death caused by photodynamic therapy. *Br J Cancer* 2003;89:1590–7.
- [38] Vantieghem A, Xu Y, Declercq W, Vandenabeele P, Denecker G, Vandenheede JR, et al. Different pathways mediate cytochrome *c* release after photodynamic therapy with hypericin. *Photochem Photobiol* 2001;74:133–42.
- [39] Reiners JJ, Caruso JA, Mathieu P, Chelladurai B, Yin XM, Kessel D. Release of cytochrome *c* and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ* 2002;9:934–44.

1.3 Relation entre la localisation subcellulaire du Foscan® et l'activation des caspases dans les cellules MCF-7 photosensibilisées

La troisième partie des travaux représente une avancée intéressante dans le cadre de la modulation de l'apoptose. La localisation intracellulaire du photosensibilisateur étant un paramètre essentiel dans l'induction de l'apoptose photoinduite, nous montrons que la manipulation du temps de contact du Foscan® avec les cellules permet de favoriser l'activation des caspases grâce à l'accumulation renforcée du photosensibilisateur dans le réticulum endoplasmique.

1.3.1. Influence de la durée d'incubation des cellules avec le Foscan® sur la localisation subcellulaire du photosensibilisateur

L'ensemble des expérimentations a été conduit sur les cellules d'adénocarcinome mammaire humain MCF-7. Grâce à une étude précédente de notre équipe, les sites privilégiés d'accumulation du Foscan® après une courte durée d'incubation (3h) des cellules avec le photosensibilisateur avaient été identifiés. Il s'agit du RE et de l'appareil de Golgi et dans une moindre mesure de la mitochondrie (111). En prolongeant le temps de contact entre les cellules et le Foscan®, nous avons observé, par microscopie confocale de fluorescence et microspectrofluorimétrie, une modification de la localisation du photosensibilisateur. En effet, la cinétique menée sur 24h indique une perte de colocalisation entre le marqueur fluorescent de l'appareil de Golgi et le Foscan®, un maintien de la colocalisation avec la sonde fluorescente du RE et un aspect inchangé en ce qui concerne la mitochondrie. Ces résultats suggèrent un renforcement de l'accumulation du Foscan® dans le RE après 24h d'incubation. Cette hypothèse est supportée par les données obtenues des dosages de la quantité relative de Foscan® dans les mitochondries par rapport à la quantité totale de Foscan® dans les cellules. Après 3h d'incubation, les mitochondries contiennent environ 30 % du Foscan® total alors que, 24h après incubation, elles ne contiennent plus que 10 % de Foscan®.

1.3.2. Relation entre le stress oxydant du réticulum endoplasmique et l'activation des caspases suite au traitement par Foscan®-PDT

L'évaluation du stress oxydant du RE après irradiation a été une étape qui nous a permis de confirmer l'implication du RE comme organite cible de la PDT avec le Foscan®. L'induction précoce de la protéine chaperone GRP78 est une caractéristique du stress oxydant du RE (155), aussi nous avons examiné l'expression de cette protéine 4h et 24h après irradiation des cellules MCF-7 incubées soit 3h, soit 24h avec le Foscan®. Après 3h d'incubation, une induction de GRP78 est observée 24h après irradiation. Après 24h d'incubation avec le Foscan®, les irradiations menées de façon à obtenir une même dose cytotoxique, produisent une induction de GRP78 dès 4h après PDT avec une augmentation de l'expression de la protéine 24h après irradiation.

L'influence du stress oxydant du RE sur la réponse mitochondriale et l'activation des caspases a ensuite été déterminée. Après 3h d'incubation avec le Foscan®, les cellules photosensibilisées montrent une libération du cytochrome c concomitante avec la dépolarisation membranaire mitochondriale dépendantes de la dose de lumière et du temps après irradiation. Vingt-quatre heures après irradiation la réponse mitochondriale concerne pratiquement la totalité des cellules pour les doses de lumière les plus fortes. Elle s'accompagne d'une activation des caspases post-mitochondriales (caspases -9, -6 et surtout -7, les MCF-7 étant déficientes en caspase-3). Après 24h d'incubation avec le Foscan®, puis irradiation, la réponse mitochondriale est diminuée et concerne environ 50 % des cellules 24h après PDT. Par contre, l'activation de la caspase-7 et, dans une moindre mesure, celle de la caspase-6 sont augmentées. De plus, la comparaison des profils d'induction de GRP78 et d'activation de la caspase-7 montre une corrélation entre les deux phénomènes. L'ensemble de ces résultats révèle un stress oxydant du RE supérieur lorsque le temps d'incubation avec le Foscan® est augmenté compatible avec une accumulation privilégiée du photosensibilisateur dans le RE. Cette augmentation du stress oxydant du RE s'accompagne d'une augmentation d'activation de la caspase-7 mais pas de la réponse mitochondriale suggérant ainsi une activation de la caspase-7 indépendamment de la mitochondrie. Une voie d'induction de l'apoptose dépendante du stress oxydant du RE qui impliquerait la rupture d'un complexe associant GRP78 et caspase-7 est suggérée.

Un autre schéma possible est un lien entre stress oxydant du RE, dommage photoinduit de la protéine Bcl-2 et augmentation de l'apoptose. Nous avons observé une

perte de l'expression de Bcl-2 dans l'extrait cellulaire total immédiatement après PDT mais pas dans l'extrait mitochondrial. Par conséquent, la protéine Bcl-2 localisée dans le RE pourrait être une cible moléculaire du Foscan®. Cependant, nous n'avons pas pu établir de relation évidente entre la photodestruction de Bcl-2 et l'activation des caspases -6 et -7.

Les résultats complets de cette étude sont présentés dans les pages suivantes sous forme d'article : S. Marchal et al, 2007, Br J Cancer Vol 96, p944-951.

Relationship between subcellular localisation of Foscan[®] and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells

S Marchal¹, A François¹, D Dumas², F Guillemain¹ and L Bezdetnaya^{*,1}

¹CRAN, Nancy University, CNRS UMR 7039, Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne, 54511 Vandœuvre-les-Nancy, France and ²Faculté de Médecine, LEMTA, Nancy University, IFR 111 and CNRS UMR 7563, BP 184, 54505 Vandœuvre-les-Nancy, France

The present study investigates the relationship between the subcellular localisation of Foscan[®] and intrinsic apoptotic pathway post Foscan[®]-based photodynamic therapy (PDT). With this purpose, mammary carcinoma MCF-7 cells were incubated with Foscan[®] for 3 or 24 h and then subjected to equitoxic light doses. Fluorescence microscopy revealed very good Foscan[®] co-localization to endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus after 3 h incubation with MCF-7 cells. Progressive increase in incubation time shows leakage of Foscan[®] from Golgi apparatus. Twenty-four hours incubation yielded a fluence-dependent enhanced induction of the ER-resident glucose-regulated protein 78 (Bip/GRP78), along with a weak mitochondrial damage, thus underscoring the ER as the main site of photodamage after prolonged incubation. Analysis of events implicated in apoptotic pathway after 24 h incubation demonstrated photodamage to Bcl-2 protein in total cellular extract, but not in the mitochondrial fraction. We further determined an increase in caspases-7 and -6 activation, which was strongly related to the expression of GRP78. The above findings demonstrate that Foscan[®] localisation in ER improves the photoactivation of the caspase-7 apoptotic pathway, which is poorly related to mitochondrial damage.

British Journal of Cancer (2007) 96, 944–951. doi:10.1038/sj.bjc.6603631 www.bjancer.com

Published online 27 February 2007

© 2007 Cancer Research UK

Keywords: photodynamic therapy; Foscan[®]; subcellular localisation; endoplasmic reticulum stress; apoptosis; caspase-7

Photodynamic therapy (PDT) has been approved as a treatment modality in various cancerous and non-cancerous lesions (Dougherty, 2002). Photodynamic therapy, through the combination of three elements, a photosensitising agent, light and oxygen, triggers the liberation of highly reactive oxygen species, leading to damage of cellular components and eventually to apoptotic and/or necrotic cell death.

Several distinct apoptotic pathways induced by photooxidative stress have recently been established (Oleinick *et al*, 2002). These include the death-receptor activation at the surface of tumour cells (extrinsic pathway) or mitochondrial outer membrane permeabilisation (intrinsic pathway). Intrinsic apoptosis can be initiated from signals that originate from or converge to intracellular organelles. An important role in the initiation of intrinsic apoptosis following PDT has been attributed to oxidative stress of the endoplasmic reticulum (ER), which proceeds through disruption of calcium homeostasis and accumulation of misfolded proteins (Mak *et al*, 2004; Wong *et al*, 2004; Kessel *et al*, 2005; Buytaert *et al*, 2006). How and to what extent photodamaged-ER contributes to apoptosis induced by PDT is still under investigation.

The short migration distance of singlet oxygen (less than 0.02 µm) suggests a narrow relationship between the sites of subcellular localisation of the photosensitiser and photodamage to

nearby organelles involved in apoptotic and/or necrotic cell death (Oleinick *et al*, 2002). It has been assumed that photosensitisers primarily localised in mitochondria are able to induce early apoptosis by rapid loss of mitochondrial transmembrane potential and/or release of apoptosis-inducing factors such as cytochrome c (cyt c), itself leading to post-mitochondrial caspase activation (Kessel and Luo, 1999; Chiu and Oleinick, 2001). Several reports investigated the possibility to modulate the mechanism of PDT-induced cell death using protocols that selectively target proapoptotic organelles (Fabris *et al*, 2001; Hsieh *et al*, 2003). Prolonged incubation of photosensitisers (24 h) with cells compared with shorter incubation times (2–3 h) was accompanied by a more efficient apoptosis after photoirradiation. This was attributed to photosensitiser relocation to mitochondria or Golgi apparatus during incubation (Fabris *et al*, 2001; Hsieh *et al*, 2003).

Foscan[®] (meta-tetrahydroxyphenylchlorin), a second-generation photosensitiser has been granted European approval for palliative treatment of advanced head and neck cancers. The efficacy of Foscan[®]-PDT in the treatment of early squamous cell carcinoma (Hopper *et al*, 2004; Lou *et al*, 2004) and other malignancies has also been recently reported (Campbell *et al*, 2004; Lovat *et al*, 2005; Shikowitz *et al*, 2005). Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus have been demonstrated as preferential sites of Foscan[®] accumulation in cultured tumour cells after 3-h incubation (Teiten *et al*, 2003a) leading to primary photodamage of these organelles upon irradiation (Teiten *et al*, 2003b). Despite that mitochondria are not specifically targeted by Foscan[®], a fluence-dependent mitochondrial depolarisation has been observed, concomitant with cyt c release immediately after

*Correspondence: Dr L Bezdetnaya;

E-mail: lbezdetnaya@nancy.fr

Received 14 December 2006; revised 18 January 2007; accepted 18 January 2007; published online 27 February 2007

Foscan®-based PDT (Chen *et al.*, 2000; Teiten *et al.*, 2003b; Marchal *et al.*, 2005) and consecutive post-mitochondrial apoptotic induction (Chen *et al.*, 2000; Marchal *et al.*, 2005). These results have suggested that initiating apoptotic events originate from ER/Golgi and/or mitochondria. The present study investigates the relationship between the subcellular localisation of Foscan® and intrinsic apoptotic pathway post Foscan®-based PDT. With this purpose, we specified subcellular distribution of Foscan® with time in mammary carcinoma MCF-7 cells and evaluated photo-induced caspases activation in relation to the dye subcellular localisation.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

Foscan® was provided by Biolitec AG (Jena, Germany). Specific organelle fluorescent probes DiOC₆ (3) (3,3'-dihexyloxacarbocyanine iodide), BODIPY FL C₈ ceramide (BPC), MitoTracker Green and the green fluorescent probe 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) were purchased from Invitrogen Molecular Probes, Cergy-Pontoise, France. APO2.7 phycoerythrin (PE)-conjugated monoclonal antibody (Beckman Coulter, Roissy, France) and the 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1) (Invitrogen Molecular Probes) were used to monitor mitochondrial dysfunction. Rabbit anti-cleaved caspase-7, rabbit anti-cleaved caspase-6, rabbit anti-cleaved caspase-9 antibodies and horseradish peroxidase (HRP)-conjugated anti-mouse or rabbit IgG antibody were obtained from Cell Signaling, Danvers, MA, USA. Mouse anti-Bcl-2 mouse, anti-cleaved poly-ADP-ribose polymerase (PARP), mouse anti-Bip/GRP78 (glucose-regulated protein 78) antibodies, caspase-positive control (camptothecin-treated Jurkat cells) and Ac-DEVD-CHO caspase-3/-7 inhibitor were purchased from BD Biosciences, Le-Pont-de-Claix, France. Goat anti-actin was provided by Tebu-bio, Le-Perray-en-Yvelines, France.

Cells

The human breast adenocarcinoma cell line MCF-7 was grown in phenol red-free RPMI 1640 medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) supplemented with 9% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany), 1% (v/v) penicillin (10 000 IU) streptomycin (10 000 µg/ml) and 1% (v/v) glutamine 200 × 10⁻³ M (Invitrogen). Cells were kept as monolayer culture in a humidified incubator (5% (v/v) CO₂ in air) at 37 °C. Cell cultures were re-seeded every week to ensure an exponential growth.

Photosensitiser

Foscan® stock solution (6 × 10⁻³ M) was performed in a solvent mixture of ethanol/polyethylene glycol/water (20:30:50, by vol) and was kept at 4 °C in the dark. Further dilution was performed in RPMI 1640 medium supplemented with 2% (v/v) FCS to reach a final Foscan® concentration of 1.5 × 10⁻⁶ M.

Confocal laser scanning microscopy

MCF-7 cells (1 × 10⁴ cells/ml) were plated into eight-well chambers Slideflask (Nunc, Roskilde, Denmark), incubated in the dark at 37 °C with 1.5 × 10⁻⁶ M Foscan® for different times (from 3 to 24 h), then rinsed in the medium and incubated with organelle-specific fluorescent probes. The ER was labelled with DiOC₆ dye, applied for 1 min at a final concentration of 2.5 µg/ml. To identify Golgi apparatus, cells were labelled with 5 × 10⁻⁶ M BPC for 30 min at 4 °C, then rinsed with Hank's buffered saline solution

containing 10 × 10⁻³ M N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulphonic acid (HEPES), pH 7.4 (Hanks' balanced salt solution (HBSS)/HEPES) and re-incubated at 37 °C for the next 30 min. The staining of mitochondria was performed by cells incubation with 500 × 10⁻⁹ M MitoTracker Green for 30 min at 37 °C. Before observation, dyes were removed by gentle rinsing with RPMI 1640 or HBSS/HEPES buffer for BPC. Double-stained cells were observed with a confocal laser-scanning microscope (SP2 AOBSS LCSM, Leica microsystem, Wetzlar, Germany). An optimal pinhole size of 60.64 µm was used to exclude fluorescence light emitted from out-of-focus plane above and below the focusing plane. An oil immersion objective (× 63) was used to capture each image of 512 × 512 pixels size. Confocal microscopy was coupled with microspectrofluorimetry to define spectral profiles of Foscan® and organelle probes in the same focal plane. Organelle-specific fluorescent probes were excited with a 488 nm argon/argon krypton laser and Foscan® was excited with a helium/neon laser at 633 nm. Band-pass emission filters of 505–550 and 640–660 nm were respectively used to discriminate organelle probes (channel 1, green) from Foscan® (channel 2, red) fluorescence.

Measurements of Foscan® intracellular concentrations

MCF-7 cells were incubated with 1.5 × 10⁻⁶ M Foscan® for 3 or 24 h. After incubation, cells were washed twice with cold phosphate-buffered saline (PBS), trypsinised, washed in PBS, resuspended in methanol and sonicated for 10 min. After centrifugation (3500 r.p.m., 5 min), supernatant was introduced into a 10 × 10-mm quartz cuvette. Fluorescence intensity from cells lysates was measured with respect to a calibration curve ranging from 0 to 0.45 × 10⁻⁶ M Foscan® in methanol. Fluorescence intensity of each sample was normalised to the protein content determined by the DC protein assay (Bio-Rad laboratories, Marnes-la-Coquette, France). Emission spectra were carried out using SAFAS luminescence spectrometer. Spectra were collected between 600 and 700 nm (excitation wavelength 422 nm; photomultiplier voltage 650 V).

Foscan® mitochondria concentration was assessed according to Laville *et al.* (2003). Briefly, mitochondria were isolated by differential centrifugation in 0.25 M ice-cold sucrose solution. Cell membranes were disrupted, centrifuged and the supernatant was further centrifuged for an additional 15 min at 6800 g. Sucrose was added to the pellet and the suspension was centrifuged twice for 15 min at 10 000 g. The last pellet consisted of mitochondrial fraction. Foscan® concentration was measured by spectrofluorimetry according to the procedure described above.

Mitochondrial preparations were analysed for contamination with ER by Western blotting for ER-marker GRP 78. By such analysis, mitochondrial fraction was judged to be >75% free of ER contamination.

Photodynamic treatment

Four days before treatment, 4 × 10⁴ cells/ml were seeded in Petri dishes and then logarithmically growing MCF-7 cells were washed twice and incubated with fresh medium containing 2% (v/v) FCS with 1.5 × 10⁻⁶ M Foscan® for 3 or 24 h before light exposure. Before photosensitisation, cells were washed three times, incubated with RPMI 9% (v/v) FCS, then irradiated at room temperature with a 650-nm laser diode (F-System, Coherent) at a fixed fluence rate of 2.12 mW/cm². Following irradiation, cells were maintained in a humidified 5% (v/v) CO₂ incubator at 37 °C for various times periods until experiments.

Cell viability assay

Cell viability was assessed by the clonogenic assay. Logarithmically growing MCF-7 cells were trypsinised immediately after PDT,

seeded in triplicate into six-well plates at a density of 500 cells per well. Nine days after treatment, medium was removed, colonies were fixed with 70% (v/v) ethanol and stained with 1% (w/v) crystal violet (Pointet Girard, Clichy, France) for 5 min. Dye excess was carefully washed off and colonies composed of more than 50 cells were counted with a robotised image analysis system (Clemex, Longueuil, Canada). Each experiment was done at least three times. Cell death percentage was obtained by referring treated samples to non-irradiated culture (drug, no light).

Immunoblotting analysis

For immunoblotting analysis, unless otherwise indicated, MCF-7 cells were collected by scraping immediately, 4 and 24 h after Foscan®-PDT. When experiments were performed in the presence of caspase-3/7 inhibitor, a 20×10^{-6} M Ac-DEVD-CHO was added to cells 30 min before irradiation and maintained with cells until analysis.

The procedure used for the Western blot detection has been described in detail (Marchal *et al*, 2005). Briefly, after protein extraction, the samples were subjected to electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels (SDS-PAGE gels). Before immunoblotting, nonspecific binding was blocked with 0.1% (v/v) Tween-20 in Tris-buffered saline containing 5% (w/v) non-fat dry milk for 1 h at room temperature. Afterwards, membranes were probed overnight at 4°C with an adapted concentration of each antibody followed by the appropriate HRP-conjugated antibody for 1 h at room temperature (1:2000). The immune complexes were detected by enhanced chemiluminescence system (GE Healthcare, Orsay, France) and visualised by autoradiography.

Probing with a mouse anti-actin antibody was used as loading control for the blots.

Flow cytometry analysis of cyt c release and mitochondrial membrane depolarization

The measurements of cyt c release and mitochondrial membrane depolarization ($\Delta\phi_m$) after PDT was assessed by flow cytometry technique (FACS Calibur, BD BioSciences) as described previously (Teiten *et al*, 2003b). Briefly, for measurements of cyt c release, permeabilised cells were labelled with PE-APO2.7 for 15 min at room temperature and subjected to flow cytometry analysis (λ_{ex} = 488; λ_{em} = 585 ± 42 nm; FL2).

The measurement of $\Delta\phi_m$ was performed by the use of JC-1 probe. Cells were centrifuged, the cell pellet was suspended in 1 ml medium containing 1 μ l of JC-1 (final concentration 5μ g ml⁻¹) and the resulting suspension was measured by flow cytometry after a 15-min incubation at 37°C. The fluorescence of JC-1 mitochondria-sequestered aggregates ($\lambda_{ex/em}$ = 488/590 nm) was detected in channel FL2 with a 585 ± 42 -nm band-pass, whereas cytoplasmic monomer fluorescence ($\lambda_{ex/em}$ = 488/527 nm) was detected in channel FL1 with a 530 $\pm$ 30-nm band-pass filter.

Statistical analysis

Mann-Whitney's *U*-test was employed to determine the statistical significance with a limit set to $P < 0.05$ using Stview 5.0 software.

RESULTS

Foscan® subcellular localisation in respect to time of incubation

In our previous study, we demonstrated that after 3 h incubation, Foscan localised primarily in the Golgi apparatus and ER of MCF-7 cells (Teiten *et al*, 2003a). In the present study, Foscan localisation in MCF-7 cells after 24 h incubation, assessed by confocal images of double-stained cells with Foscan® and specific-organelle

fluorescent probes together with topographic profiles are depicted in Figure 1. Good superposition between Foscan® and specific probes is revealed in yellow.

Co-staining images and topographic profiles of Foscan® and MitoTracker green revealed a weak correlation, thus pointing out a scarce localisation of Foscan® in mitochondria (Figure 1A and B). At the same time, Foscan® was particularly well localised in ER, as demonstrated by the perfect overlap of Foscan® and DiOC6 in topographic profiles (Figure 1D). In contrast to 3 h incubation, characterised by the good dye localisation in Golgi apparatus (Teiten *et al*, 2003a), the staining patterns and topographic profiles of Golgi probe BPC and Foscan after 24 h incubation did not show any overlap (Figure 1E and F). Foscan® accumulation in the Golgi apparatus was further mapped in the time span of 3–24 h (Figure 2). After 3–6 h incubation, a good localisation of Foscan® in the Golgi apparatus was evidenced by a yellow pattern in the dual-staining images and a very good overlap in fluorescence topographic profiles (Figure 2). However, from 12 h incubation a progressive extrusion of Foscan® from the Golgi becomes noticeable with increasing mismatch between Foscan® and BPC images and profiles.

Fluence-dependent cell photoinactivation with respect to incubation time

Cells incubated with Foscan® for 3–24 h were subjected to the range of light fluences and their photocytotoxicity was further assessed by clonogenic assay. Table 1 displays the light fluences at which the same levels of photocytotoxicity (equitoxic light doses) were achieved under both incubation conditions. For all selected lethal doses (from LD₆₃ to LD₉₇), an incubation time of 24 h necessitated a six- to 12-fold lower light fluence than 3 h incubation.

GRP78 protein photoinduction in MCF-7 cells with respect to incubation time

GRP78 induction, a stress associated ER resident protein, was assessed 4 h and 24 h post-PDT after both incubation times using Western blotting (Figure 3). Cells subjected to short incubation periods with Foscan® did not reveal any changes in GRP78 expression 4 h post-PDT (Figure 3A), whereas an upregulation of GRP78 was observed at all light fluences 24 h after illumination (Figure 3A). When cells were incubated with the dye for 24 h, protein induction occurred as soon as 4 h post-PDT starting from LD₈₅ and was significantly enhanced at all light doses 24 h post-PDT (Figure 3B).

Mitochondria and total Foscan® intracellular content

Table 2 presents Foscan® content measured by spectrofluorimetry following extraction from whole cells and mitochondria. After 3 and 24 h incubation, whole cellular content was $9.4 \pm 0.4 \times 10^{-11}$ mol Foscan® mg⁻¹ protein and $76.0 \pm 5.7 \times 10^{-11}$ mol Foscan® mg⁻¹ protein, respectively. Foscan® concentrations in mitochondria were $3.3 \pm 2.2 \times 10^{-11}$ mol Foscan® mg⁻¹ protein and $7.7 \pm 2.7 \times 10^{-11}$ mol Foscan® mg⁻¹ protein, respectively, for 3 and 24 h incubation. The mitochondrial fraction of Foscan® represented 33.6 ± 3.7 and $10.2 \pm 1.2\%$ of the total cellular content at 3 and 24 h incubation, respectively.

Photoinduced mitochondrial damage with respect to incubation time

Flow cytometry evaluation of cyt c release and collapse of $\Delta\phi_m$ from photodynamically treated cells were performed immediately 24 h post-PDT.

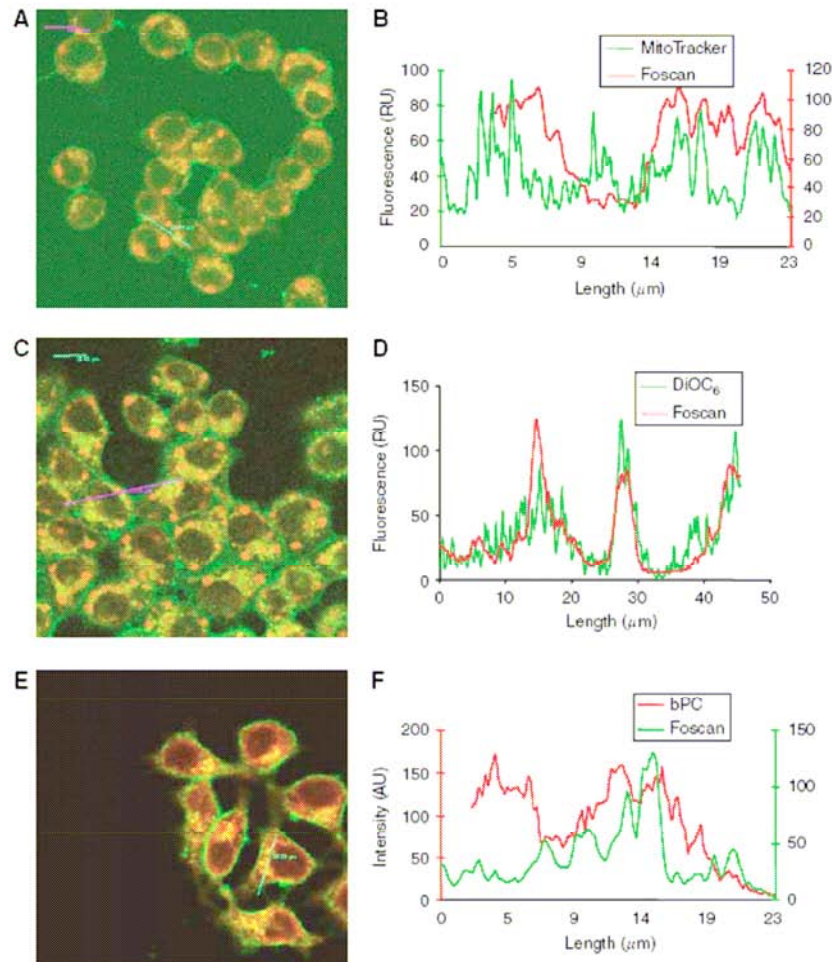


Figure 1 Foscan® localisation in MCF-7 cells. (A, C, E; left panel) Confocal overlay images and (B, D, F; right panel) fluorescence topographic profiles of MCF-7 cells double-stained with Foscan® and organelle probes. Arrow indicates the analysed longitudinal transcellular zone. Cells were sensitised with 1.5×10^{-6} M Foscan® for 24 h, washed and subjected to organelle staining. (A, B) Mitochondria were labeled with 500×10^{-9} M MitoTracker green for 30 min at 37°C. (C, D) ER was stained with $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ DiOC6 for 1 min. (E, F) Golgi apparatus was labeled with 5×10^{-6} M BPC for 30 min at 4°C. Organelle-specific probes were excited with a 488 nm; Foscan® was excited at 633 nm. Objective magnification $\times 63$.

Mitochondrial damage in cells incubated 3 h with Foscan® and assessed immediately after PDT was dose-dependent as shown in Figure 4A and C. For low fluences (LD_{63} and LD_{85}) both cyt *c* release and $\Delta\phi_m$ was not significantly different from control cells ($P > 0.05$), whereas at LD_{93} and LD_{97} we observed a significant increase in both parameters (Figure 4A and C). Mitochondrial damage 24 h post-PDT demonstrated a significant dose-dependent increase in cyt *c* release and loss of $\Delta\phi_m$ (Figure 4A and C).

Cells subjected to 24 h incubation with Foscan® demonstrated much less pronounced mitochondrial photodamage compared with 3 h incubation, irrespective of the time post-PDT (Figure 4B and D). For instance, measurements carried out 24 h post-PDT showed from 5 (LD_{63}) to 45% (LD_{97}) of damaged cell (Figure 4B and D), whereas equitoxic doses applied after 3 h incubation resulted in mitochondrial damage of 20 and 85% of cells (Figure 4A and C).

Therefore, the mitochondrial response was considerably decreased when cells were submitted to prolonged Foscan® incubation.

Activation of post-mitochondrial caspases cascade pathway

We further investigated the activation of post-mitochondrial apoptotic events by Western blot analysis of the proteolytic cleavage of caspases -9, -7, -6 and PARP in Foscan® photo-sensitised cells at 24 h post-PDT.

Immunoblotting revealed a dose-dependent cleavage of caspases-9, -7, -6 and PARP after both incubation times (Figure 5) with an increased expression at first three light fluences, followed by reduced cleavage at the highest applied fluence. Compared with cleaved caspase-7 and PARP, caspase-9- and caspase-6-cleaved fragments displayed discrete expression. For long incubation times, expression of cleaved caspase-7, -6 and PARP was obviously higher and enzyme cleavage occurred at lower light doses (LD_{63} for 24 h vs LD_{93} for 3 h).

Effect of Foscan®-PDT on Bcl-2 protein expression

Expression of Bcl-2 protein was assessed immediately after irradiation of cells preloaded with Foscan® for 24 h as well as

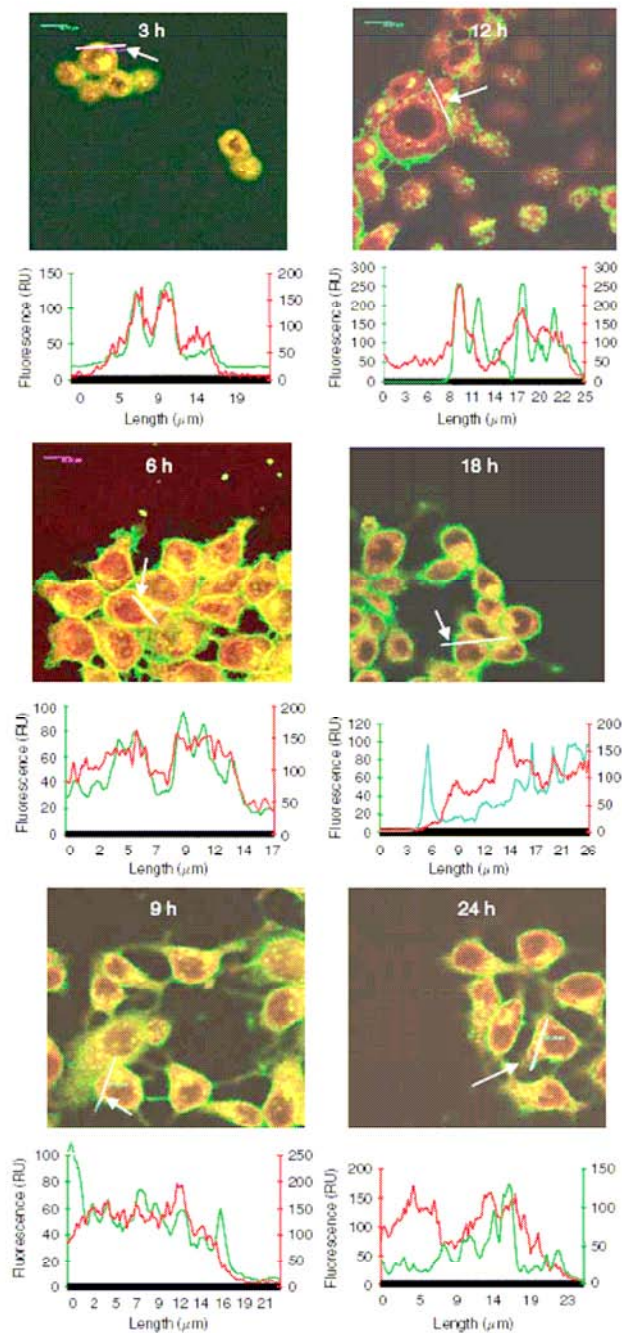


Figure 2 Kinetic of Foscan[®] localisation in Golgi apparatus in MCF-7 cells. Cells were sensitised with 1.5×10^{-6} M Foscan[®] from 3 to 24 h incubation time, washed and subjected to staining with 5×10^{-6} M BPC for 30 min at 4°C. Fluorescence topographic profiles of MCF-7 cells double-stained with Foscan[®] and BPC are presented under confocal overlay images of MCF-7 cells double-stained with BPC (arrow indicates the analysed longitudinal transcellular zone). Organelle-specific probes were excited at 488 nm; Foscan[®] was excited at 633 nm. Objective magnification $\times 63$.

from whole cell extract from mitochondrial fraction (Figure 6). Bcl-2 measured in the whole extract was unaffected at LD₈₅ but decreased with increasing light doses. In opposition, this protein remained unchanged at all applied fluences in mitochondrial fraction.

DISCUSSION

Mechanism of cell death induced by photooxidative stress is tightly related to the sites of intracellular photosensitiser accumulation. As such, a better comprehension of the role of specific organelles

in mediating apoptotic photoinduced response provides a possibility to manipulate the cell death machinery.

Confocal microscopy investigation of Foscan® intracellular distribution together with the evaluation of enzymatic post-

Table 1 Light fluences (J cm^{-2}) and corresponding irradiation times (s) inducing the same level of photocytotoxicity in MCF-7 cells under 3 and 24 h incubation with Foscan®

Photocytotoxicity ^{a,b}	Fluence, J cm^{-2} (irradiation time, s)	
	3 h	24 h
63% (± 17.1)	0.06 (30)	0.011 (5)
85% (± 8.8)	0.13 (60)	0.021 (10)
93% (± 6.3)	0.38 (180)	0.032 (20)
97% (± 2.2)	0.74 (330)	0.064 (30)

^aPhotocytotoxicity of Foscan® was assessed *in vitro* using clonogenic assay. Cells were incubated with 1.5×10^{-6} M Foscan® for 3 or 24 h before irradiation with light doses producing 63 (LD₆₃), 85 (LD₈₅), 93 (LD₉₃) and 97 (LD₉₇) cell mortality. ^bMean $\pm$ s.d. (in italic) of at least triplicate experiments.

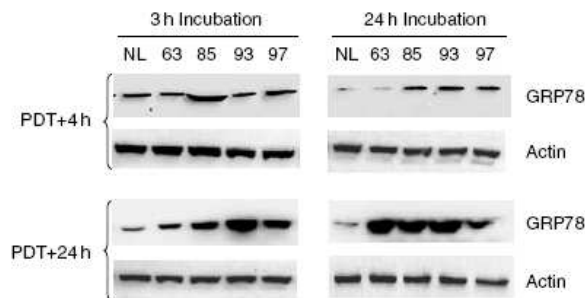


Figure 3 Fluence-dependent GRP78 protein expression in MCF-7 cells. (A) MCF-7 cells were incubated with 1.5×10^{-6} M Foscan® for 3 h or (B) 24 h and subjected to equitoxic light doses. Western Blotting of GRP78 and actin protein expression was determined from cell lysates at 4 and 24 h after PDT. Control cells (NL) were subjected to Foscan® only (drug, no light).

irradiation activity of selected organelles after 3 h incubation provided an unambiguous evidence of Foscan® localisation in the ER and Golgi apparatus (Teiten *et al*, 2003a). In the present report, confocal microscopy investigation of Foscan® intracellular distribution showed that prolonging incubation time to 24 h induced variations in its subcellular distribution. Very good Foscan® localisation in ER along with a weak distribution in mitochondria was maintained with time (Figure 1). The main difference observed was the poor localisation in the Golgi apparatus after 24 h, suggesting extrusion of Foscan® from Golgi with time. Cogent evidence was given by kinetic of Foscan® relocation over a 24-h period. Good localisation of Foscan® in Golgi apparatus observed at 3 h incubation vanished progressively with time and starting from 12 h, the BPC and Foscan® fluorescence profiles were clearly different, indicating a poor affinity of Foscan® for this organelle (Figure 2). Based on this localisation pattern, and also that only 10% of total intracellular Foscan® content was found in mitochondria (Table 2), we supposed a predominant accumulation of Foscan® in the ER after 24 h incubation. Further confirmation of the enhanced presence of Foscan® in the ER was obtained in the study of the ER-resident GRP78 protein expression after PDT. This chaperone protein is known to be induced by the unfolded protein response to alleviate ER stress and maintain cell survival (Rao *et al*, 2002). By using mitochondria- and/or ER-targeting photosensitisers, dose-dependent elevation of GRP78 has been observed in few hours post-irradiation, thus assuming a classic ER oxidative stress response following PDT (Mak *et al*, 2004; Wong *et al*, 2004).

Table 2 Foscan® concentration^{a,b} in whole cells and in mitochondria fraction with respect to the time of incubation with MCF-7 cells

	3 h	24 h
	mol mg protein ⁻¹	mol mg protein ⁻¹
Total cell concentration	$9.4 \times 10^{-11} \pm 0.4$	$76.0 \times 10^{-11} \pm 5.7$
Mitochondria concentration	$3.3 \times 10^{-11} \pm 2.2$	$7.7 \times 10^{-11} \pm 2.7$
Relative content ^c	$33.6 \pm 3.7\%$	$10.2 \pm 1.2\%$

^aFoscan® concentration was assessed by fluorescence spectrometry from cell lysate. ^bMean $\pm$ s.d. of at least triplicate determinations. ^cRelative content calculated as the percentage of Foscan® concentration in mitochondria to the intracellular Foscan® concentration.

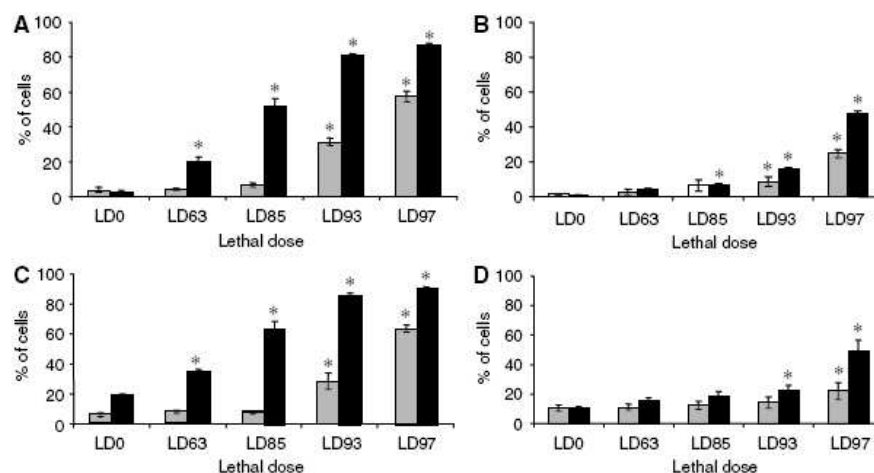


Figure 4 Fluence-dependent mitochondria membrane photodamage. (A, B) Fluence-dependent cyt c release and (C, D) mitochondrial membrane depolarisation in Foscan®-photosensitized MCF-7 cells. MCF-7 cells were incubated with 1.5×10^{-6} M Foscan® for (A, C) 3 h or (B, D) 24 h and subjected to equitoxic light doses. Photosensitized MCF-7 cells were analysed immediately (□) and 24 h after irradiation (■). Results are the mean $\pm$ s.e.m. of at least three independent experiments. *, significantly different from control values.

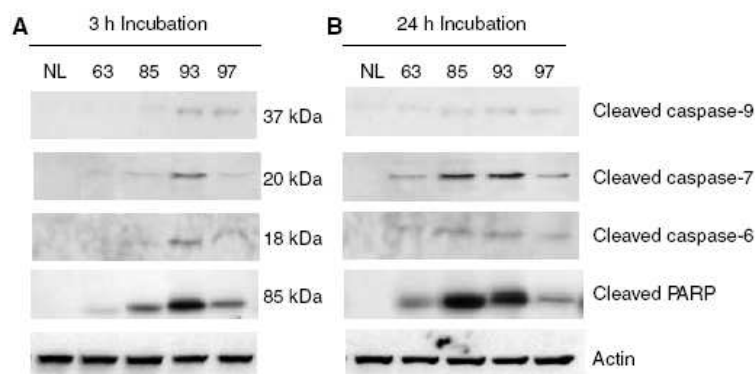


Figure 5 Fluence-dependent caspases activation in Foscan[®]-photosensitized MCF-7 cells. **(A)** MCF-7 cells were incubated with 1.5×10^{-6} M Foscan[®] for 3 h or **(B)** 24 h and subjected to equitoxic light doses. Western blotting was determined from cell lysates at 24 h after PDT by using specific antibodies of caspase-9, -7, -6 and PARP-cleaved forms. Control cells (NL) were subjected to Foscan[®] only (drug, no light).



Figure 6 Fluence-dependent Bcl-2 expression in Foscan[®]-photosensitized MCF-7 cells. **(A)** From whole cell extract and **(B)** from mitochondrial fraction. Before irradiation, MCF-7 cells were incubated with 1.5×10^{-6} M Foscan[®] for 24 h. Western blotting was determined from cell lysates immediately after PDT. Control cells (NL) were subjected to Foscan[®] only (drug, no light).

Compared with cells incubated for 3 h, cells incubated with Foscan[®] for 24 h and subjected to equitoxic light doses exhibited higher upregulation of GRP78 (Figure 3). These combined results indicate that prolonged incubation favours ER localisation. It is pertinent to notice that clinical therapy with Foscan[®] uses 96 h time interval between administration and irradiation suggesting that the ultimate localisation pattern involves the ER.

Short incubation time favoured massive mitochondrial membrane injury irrespective of time post-PDT (Figure 4). Moreover, all light fluences, except the lowest one (LD₆₃), yielded significant cyt *c* release and collapse of $\Delta\varphi_m$ right after PDT (Figure 4A and C), thus presuming direct mitochondrial photodamage. Alternative explanation for the cyt *c* release and loss of $\Delta\varphi_m$ could be a translocation of the proapoptotic protein Bax during irradiation (Kessel and Castelli, 2001). The process of the Bax insertion into the mitochondrial membrane is sensitive to temperature (Pryde *et al*, 2000). Therefore, in the next step we conducted both cell irradiation (LD₉₃) and measurements of $\Delta\varphi_m$ at 15°C, the temperature at which Bax penetration into mitochondria is suppressed. Upon these conditions, we observed an immediate loss of $\Delta\varphi_m$ comparable with that at 37°C (27.3 ± 4.2 vs $33.3 \pm 6.1\%$), thus ruling out indirect mitochondria damage.

We studied further the apoptotic events induced by PDT in relation to specific Foscan[®] localisation.

Considering that MCF-7 cells are deficient in caspase-3, they are able to undergo apoptosis through pathways different from caspase-3 activation (Janicke *et al*, 1998). Caspases-6 and -7 may partially substitute caspase-3 in these cells suggesting that post-mitochondrial cascade of caspases activation, successively involving caspases-9, -7 and -6, governs apoptosis in MCF-7 cells (Slee *et al*, 2001).

It has been shown that PDT-induced activation of caspase-9 requires the cyt *c* release from mitochondria (Oleinick *et al*, 2002).

The massive photoinduced cyt *c* release after 3 h, but not after 24 h incubation (Figure 4A), may suggest an elevated expression of cleaved caspase-9 under 3 h incubation. However, Figure 5 indicates a weak expression of cleaved caspase-9, without obvious difference in its activation at both incubation times. A plausible explanation could be an observation of the close relationship between the presence of active caspase-3 and procaspase-9 processing. Indeed, cyt *c*-mediated processing of procaspase-9 was reported to be strongly impaired in caspase-3-deficient cells (Blanc *et al*, 2000; Xue *et al*, 2001b).

Activation of caspases 6, -7 and PARP cleavage were studied 24 h post-PDT (Figure 5). For both incubation times we observed the cleavage of caspases 6, -7 and PARP at all light doses, except the highest one (Figure 5). This could be related to the inhibition of apoptosis in favour of necrosis on excess of oxidative damage (Marchal *et al*, 2005). In the presence of Ac-DEVD-CHO, a specific inhibitor of caspase-7, a complete inhibition of the proteolytic process of caspase-7, -6 and PARP was registered (data not shown), thus indicating that apoptotic pathway was primarily governed by caspase-7. The major role of caspase-7 in apoptotic mechanism in MCF-7 cells has been already reported (Mooney *et al*, 2002).

Compared to 3 h incubation, Western blotting demonstrated much stronger expression of cleaved caspases-6, -7 and PARP in cells subjected to equitoxic doses after 24 h incubation (Figure 5A and B). These results are consistent with the improved GRP78 induction (Figure 3) along with the weak mitochondrial damage (Figure 4B) in cells after prolonged incubation. The mechanism underlying ER stress-associated apoptosis is poorly understood. It has been proposed recently that caspase-7 could be involved in ER stress-induced apoptosis through its association with a subpopulation of GRP78 existing as an ER transmembrane protein (Reddy *et al*, 2003; Rao *et al*, 2004; Wu *et al*, 2005). Basically, caspase-7 and GRP78 bind to each other (Wu *et al*, 2005) preventing the activation of caspase-7 (Reddy *et al*, 2003). However, under severe ER stress the complex could disrupt resulting in caspase-7 activation (Rao *et al*, 2002; Wu *et al*, 2005). This explanation can also stand for the results obtained in the present study and account for an apoptotic pathway that is different from the classical post-mitochondrial process. Another scenario for the observed apoptotic effects could be offered by the photodamage to Bcl-2 protein. Photochemical destruction of both mitochondrial- and ER-localised Bcl-2 followed by apoptosis has been demonstrated in several studies (Kessel and Castelli, 2001; Xue *et al*, 2001a). Therefore, rather examined Bcl-2 photodamage after prolonged incubation of cells with Foscan[®]. We observed

dose-dependent loss of Bcl-2 in whole cell extract, whereas no obvious signs of its photodestruction were noticed in mitochondrial fraction (Figure 6). These results point out that ER-localised Bcl-2 could be a possible target of Foscan®-induced photodamage. It has recently been demonstrated that ER-resident Bcl-2 controls apoptosis through sequestration/inactivation of proapoptotic mitochondria BH3-only proteins that activate Bax (Thomenius *et al*, 2003). However, we failed to establish a clear relationship between Bcl-2 photodestruction and caspases activation as caspase-6, -7 and PARP-cleavage was maximum at LD₈₅ (Figure 5B), whereas expression of Bcl-2 was unaffected at this fluence (Figure 6A).

REFERENCES

- Blanc C, Deveraux QL, Krajewski S, Janicke RU, Porter AG, Reed JC, Jaggi R, Marti A (2000) Caspase-3 is essential for procaspase-9 processing and cisplatin-induced apoptosis of MCF-7 breast cancer cells. *Cancer Res* 60: 4386–4390
- Buytaert E, Callewaert G, Hendrickx N, Scorrano L, Hartmann D, Missiaen L, Vandenheede JR, Heirman I, Grooten J, Agostinis P (2006) Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *FASEB J* 20: 756–758
- Campbell SM, Gould DJ, Salter L, Clifford T, Curnow A (2004) Photodynamic therapy using meta-tetrahydroxyphenylchlorin (Foscan) for the treatment of vulval intraepithelial neoplasia. *Br J Dermatol* 151: 1076–1080
- Chen JY, Mak NK, Yow CM, Fung MC, Chiu LC, Leung WN, Cheung NH (2000) The binding characteristics and intracellular localization of temoporfin (mTHPC) in myeloid leukemia cells: phototoxicity and mitochondrial damage. *Photochem Photobiol* 72: 541–547
- Chiu SM, Oleinick NL (2001) Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy. *Br J Cancer* 84: 1099–1106
- Dougherty TJ (2002) An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg* 20: 3–7
- Fabris C, Valduga G, Miotto G, Borsetto L, Jori G, Garbisa S, Reddi E (2001) Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res* 61: 7495–7500
- Hopper C, Niziol C, Sidhu M (2004) The cost-effectiveness of Foscan-mediated photodynamic therapy (Foscan-PDT) compared with extensive palliative surgery and palliative chemotherapy for patients with advanced head and neck cancer in the UK. *Oral Oncol* 40: 372–382
- Hsieh Y-J, Wu C-C, Chang C-J, Yu J-S (2003) Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J Cell Physiol* 194: 363–375
- Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG (1998) Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 273: 9357–9360
- Kessel D, Castelli M (2001) Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. *Photochem Photobiol* 74: 318–322
- Kessel D, Castelli M, Reiners JJ (2005) Ruthenium red-mediated suppression of Bcl-2 loss and Ca(2+) release initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum: scavenging of reactive oxygen species. *Cell Death Differ* 12: 502–511
- Kessel D, Luo Y (1999) Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. *Cell Death Differ* 6: 28–35
- Laville I, Figueiredo T, Look B, Pigaglio S, Maillard P, Grierson DS, Carrez D, Croisy A, Blais J (2003) Synthesis, cellular internalization and photodynamic activity of glucoconjugated derivatives of tri and tetra(meta-hydroxyphenyl)chlorins. *Bioorg Med Chem* 11: 1643–1652
- Lou PJ, Jager HR, Jones L, Theodossy T, Bown SG, Hopper C (2004) Interstitial photodynamic therapy as salvage treatment for recurrent head and neck cancer. *Br J Cancer* 91: 441–446
- Lovat LB, Jamieson NF, Novelli MR, Mosse CA, Selvasekar C, Mackenzie GD, Thorpe SM, Bown SG (2005) Photodynamic therapy with m-tetrahydroxyphenyl chlorin for high-grade dysplasia and early cancer in Barrett's columnar lined esophagus. *Gastrointest Endosc* 62: 617–623
- Mak NK, Li KM, Leung WN, Wong RN, Huang DP, Lung ML, Lau YK, Chang CK (2004) Involvement of both endoplasmic reticulum and mitochondria in photokilling of nasopharyngeal carcinoma cells by the photosensitizer Zn-BC-AM. *Biochem Pharmacol* 68: 2387–2396
- Marchal S, Fadloun A, Maugain E, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L (2005) Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids. *Biochem Pharmacol* 69: 1167–1176
- Mooney LM, Al-Sakkaf KA, Brown BL, Dobson PR (2002) Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. *Br J Cancer* 87: 909–917
- Oleinick N, Morris RL, Belichenko I (2002) The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci* 1: 1–21
- Pryde JG, Walker A, Rossi AG, Hannah S, Haslett C (2000) Temperature-dependent arrest of neutrophil apoptosis. Failure of Bax insertion into mitochondria at 15 degrees C prevents the release of cytochrome c. *J Biol Chem* 275: 33574–33584
- Rao RV, Castro-Obregon S, Frankowski H, Schuler M, Stoka V, del Rio G, Bredesen DE, Ellerby HM (2002) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* 277: 21836–21842
- Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11: 372–380
- Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS (2003) Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem* 278: 20915–20924
- Shikowitz MJ, Abramson AL, Steinberg BM, DeVoti J, Bonagura VR, Mullooly V, Nouri M, Ronn AM, Inglis A, Mc Clay J, Freeman K (2005) Clinical trial of photodynamic therapy with meso-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin for respiratory papillomatosis. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 131: 99–105
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ (2001) Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276: 7320–7326
- Teiten MH, Bezdetnaya L, Morliere P, Santus R, Guillemin F (2003a) Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan® localization in cultured tumor cells. *Br J Cancer* 88: 146–152
- Teiten MH, Marchal S, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L (2003b) Primary photodamage sites and mitochondrial events after Foscan photosensitization of MCF-7 human breast cancer cells. *Photochem Photobiol* 78: 9–14
- Thomenius MJ, Wang NS, Reineks EZ, Wang Z, Distelhorst CW (2003) Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy regulates Bax activity by binding to BH3-only proteins. *J Biol Chem* 278: 6243–6250
- Wong S, Luna M, Ferrario A, Gomer CJ (2004) CHOP activation by photodynamic therapy increases treatment-induced photosensitization. *Lasers Surg Med* 35: 336–341
- Wu Y, Zhang H, Dong Y, Park YM, Ip C (2005) Endoplasmic reticulum stress signal mediators are targets of selenium action. *Cancer Res* 65: 9073–9079
- Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL (2001a) Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Oncogene* 20: 3420–3427
- Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL (2001b) Photodynamic therapy-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a role for caspase-3 in the late steps of apoptosis but not for the critical lethal event. *Exp Cell Res* 263: 145–155

2. DETECTION EN IMMUNOHISTOLOGIE DE L'ACTIVATION DES CASPASES -3 ET -7

2.1. Intérêt de l'utilisation de l'anticorps anti-PARP clivé

La dernière étude de cette thèse a pour but d'évaluer l'utilisation, en immunohistochimie, d'anticorps permettant de mettre en évidence l'activation des deux principales caspases effectrices de l'apoptose, caspase-3 et caspase-7. A cet égard, l'utilisation d'un anticorps dirigé contre un néoépitope de PARP, généré par l'action protéolytique de ces deux caspases, présente l'avantage de détecter l'apoptose dépendante de l'une ou l'autre des caspases. Les essais ont été effectués sur des coupes déparaffinées de prélèvements fixés 24h après traitement. *In vitro*, des cellules en monocouche ou des sphéroïdes HT29 ont été traités par paclitaxel ou Foscan®-PDT pour induire l'apoptose. *In vivo*, des tumeurs HT29 xénogreffées ont été photosensibilisées avec le Foscan®. Les résultats obtenus avec les trois anticorps anti-PARP clivée, anti-caspase-3 et anti-caspase-7 actives sont comparés. Il en résulte que, dans les prélèvements non traités, le nombre de cellules dans lesquelles PARP clivée est observée, est systématiquement inférieur à celui des cellules marquées caspase-3 ou caspase-7 active. Par contre, les prélèvements pour lesquels une induction d'apoptose a été produite *in vitro*, que ce soit par le paclitaxel ou la PDT montrent un nombre équivalent de cellules marquées par les trois anticorps. Il n'en est pas de même pour les tumeurs où, même après induction de l'apoptose par la PDT, le nombre de cellules apoptotiques détectées par l'anticorps anti-PARP clivée reste inférieur à celui des cellules présentant un marquage pour caspase-3 active. Des études en immunofluorescence de coupes tissulaires traitées successivement par 2 anticorps différents ont permis d'observer par superposition d'images une bonne co-localisation entre caspase-3 active et PARP clivée. Cependant l'expression de la PARP clivée est particulièrement faible dans les cellules apoptotiques des tumeurs contrôles ce qui suggère soit une faible quantité d'antigènes fixés par l'anticorps soit un confinement à l'intérieur du noyau. Cette dernière hypothèse est accréditée par l'examen minutieux des coupes immunohistologiques qui révèle un marquage non pas sur la totalité du nucleoplasme mais dans une portion limitée du noyau. Après traitement, le nombre de cellules apoptotiques exprimant largement PARP clivée augmente. Ces résultats montrent que la détection du clivage de PARP en cas d'apoptose physiologique est

difficile ce qui entraîne une sous-estimation du nombre de cellules apoptotiques. Par contre, après traitement, l'estimation des cellules apoptotiques marquées par l'anticorps anti-PARP clivée pourrait être représentative de l'effet apoptotique du traitement.

2.2. Prédominance de l'activation de la caspase-3 dans les tumeurs HT29 traitées par Foscan®-PDT

Le deuxième résultat intéressant de cette étude résulte dans la différence obtenue entre l'induction de l'apoptose par Foscan®-PDT *in vitro* dans les cellules et les sphéroïdes et celle obtenue *in vivo* dans les tumeurs HT29. Dans le premier cas, le nombre de cellules marquées par les anticorps anti-caspase-3 et anti-caspase-7 actives est équivalent. Dans les tumeurs traitées par PDT, le nombre de cellules marquées pour caspase-3 active est supérieur à celui des cellules montrant une activation de caspase-7. Les analyses par immunofluorescence confirment que certaines cellules sont marquées caspase-3 et caspase-7 actives mais d'autres ne présentent qu'un marquage caspase-3. Ces résultats suggèrent que, dans les tumeurs traitées par Foscan®-PDT, une voie apoptotique dépendante de la caspase-3 prédomine.

Ces résultats sont présentés dans les pages suivantes sous forme de manuscrit en vue d'une soumission pour publication.

Assessment of apoptosis by immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7 or cleaved PARP in monolayer cells, spheroid and subcutaneous xenografts of HT29 human colon adenocarcinoma

Short title: immunohistochemistry to active caspase-3, -7 or cleaved PARP

A Bressenot¹, S Marchal², L Bezdetnaya², J Garrier², F Guillemain² and F Plénat^{1*}

¹Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, Hôpital de Brabois, CHRU Nancy, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy, F

²CRAN-CNRS UMR7039 Nancy Université, Centre Alexis Vautrin 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy, F

Correspondence to F Plénat, Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques, CHU de Brabois, Allée du Morvan, 54511 Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France

Acknowledgements: we thank Biolitec AG for providing the Foscan®

Abstract

Immunohistochemistry to active caspase-3 has recently been recommended for the detection of apoptosis in tissue. This method however is inappropriate to detect apoptosis involving caspase-7, whereas cleavage of Poly-ADP-ribose polymerase (PARP), a major substrate of both caspases-3 and -7, is a valuable marker of apoptosis. Evaluation of apoptosis induced *in vitro* either by paclitaxel or by photodynamic treatment (PDT) with Foscan® in HT29 cell monolayer and spheroids yielded an equivalent rate of apoptotic cells whatever the antibody used, whereas in control specimens, cleaved PARP (c-PARP) immunostaining failed to detect apoptosis as efficiently as active caspase-3 or -7 immunostaining. Further investigations in HT29 xenografts subjected or not to Foscan®-PDT resulted in a significant higher number of active caspase-3 labelled cells although immunofluorescence analysis demonstrated c-PARP and active caspase-3 perfectly co-localized. A restricted expression of c-PARP was obvious in the greater part of caspase-3 expressing cells from control tumour, whereas photosensitised tumours displayed a higher number of apoptotic cells expressing large fluorescent spots from both active caspase-3 and c-PARP. Taken together, these results support the assumption that c-PARP expression was dependent on treatment-induced apoptosis. Therefore, c-PARP could be a valuable marker to determine treatment-induced apoptosis. On the other hand, the absence of caspase-7 activation in some caspase-3 expressing cells from tumours undergoing Foscan®-PDT demonstrates the relevance of using antibodies which can discriminate caspase-dependent apoptotic pathways.

Keywords: apoptosis; caspase-3; caspase-7; PARP

Introduction

The molecular and biochemical events of apoptotic cell death have been extensively studied (reviewed in (Jin and El-Deiry 2005)). Many anticancer drugs induce apoptosis by molecular mechanisms mediated through mitochondrial dysfunction (Green and Kroemer 2004). Release of cytochrome c from the internal part of the mitochondrial membrane into the cytoplasm results in the activation of caspase cascades, in particular caspases -9, -3, -6 and -7. Since caspase-3 is the main executioner of apoptosis, immunohistochemistry to the active form of caspase-3 (active casp-3) has been run to check apoptosis in paraffin sections from various tissue (Duan et al. 2003; Gown and Willingham 2002; Jakob et al. 2008; Resendes et al. 2004) and has been recommended in clinical trials as biomarker of PDT activity in vivo (Miller et al. 2007). However, it is important to note that apoptosis may also occurs through an activation of other executioner caspases such as caspase-7 that could be activated through a mechanism independent of the mitochondrial pathway (Davidson et al. 2005; Pyrko et al. 2007). Moreover, caspase-7 could partially substitute caspase-3 in caspase-3 deficient cells (Lakhani et al. 2006; Mooney et al. 2002). Many protein targets of active caspases are biologically important apoptotic indicators of morphological and biochemical changes associated with apoptosis (Degterev et al. 2003). One of the essential substrates cleaved by both caspase-3 and -7 is Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) an abundant DNA-binding enzyme which detects and signals DNA strand breaks (Decker and Muller 2002). The presence of cleaved PARP-1 is one of the most utilized diagnostic tools for the detection of apoptosis in many cell types. The cleavage of PARP-1 into two fragments of 89 kDa and 24 kDa has been considered indicative of functional caspase activation (Koh et al. 2005).

In the present study, we assess apoptosis by using monoclonal antibodies to active caspase-3, active caspase-7 and cleaved PARP (c-PARP) in order to give a precise insight on the relevance of each marker for the immunohistochemical detection of apoptosis. Moreover, the accuracy of antibodies to active caspase-7 and c-PARP to detect apoptosis in histopathology have never been reported. Apoptosis was induced in vitro by paclitaxel (Banerjee et al. 1997) or by photodynamic treatment (PDT) with Foscan® (Marchal et al. 2005) in monolayer or spheroids growing HT29 colon adenocarcinoma cells. For the in vivo experiments, we used xenografted HT29 tumours in nude mice that were subjected to Foscan®-PDT.

Material and methods

Cell and tissue samples

Monolayer cell culture

The HT29 human colon adenocarcinoma cell line (ATCC, Rockville, MM, USA) was grown in RPMI-1640 medium (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) without phenol red and glutamin, supplemented with 10% heat-inactivated foetal calf serum (FCS) (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany), 1% penicillin (10,000 IU), streptomycin (10,000 µg/ml) and 1% 200 mM glutamin (Invitrogen). Cells were kept at 37°C in a 5% CO₂ humidified atmosphere, trypsinized and re-seeded into fresh medium every 7 days.

Spheroid cell culture

Multicell spheroids were initiated as previously described (Marchal et al. 2005). Briefly, 5×10^4 HT29 cells were seeded into 75 cm² flasks previously coated with 1% L-agarose. After 3 days, aggregates were transferred to 250 ml spinner flasks (Integra Biosciences, Chur, CH) containing 150 ml of culture medium. The flasks were placed on magnetic

plates (Integra Biosciences) at 75 rpm in 5% CO₂ and 37°C humidified atmosphere for 15 days. Spheroids about 500 µm in diameter were used in experiments.

Xenografted tumour

Studies were performed using female athymic Swiss *Foxn^{1nu} /Foxn^{1nu}* mice (Harlan France, Gannat, France). All animal experiments were carried out in compliance with the French Animal Scientific Procedures Act (April 1988). Mice were housed in plastic cages under standard conditions (25°C, 50% relative humidity, 12 h light/dark cycle) and provided with food and water *ad libitum*. Procedure to induce HT29 tumour in nude mice was performed as previously described (Coutier et al. 2002). Briefly, 0.1 ml of 8 x 10⁷ HT29 cells/ml in 5% glucose solution was inoculated subcutaneously into the right hind foot. The mice were treated 15 days later when the tumours reached 5 mm in diameter.

Induction of apoptosis

Paclitaxel treatment of monolayer and spheroids HT29 cells

Monolayer cells

3 x 10⁴ HT29 cells/ml were seeded into 75 cm² flasks. Forty eight h after seeding, Paclitaxel (Taxol®, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), dissolved in 95% ethanol (100 µM), was added to the culture medium at the final concentration of 0.1 µM. Treatment was carried out for 48 h. Control cells were treated with 95% ethanol alone (dilution 1:1000 v/v).

Spheroids

About 80 spheroids were collected and seeded in 2 ml of supplemented medium containing 0.1 µM Paclitaxel for 48 h. Control spheroids were incubated with supplemented medium containing only ethanol (dilution 1:1000 v/v).

Photodynamic treatment

Drug preparation and administration

Foscan[®] (mTHPC) was kindly supplied by Biolitec AG (Jena, Germany). Foscan[®] stock solution was prepared in methanol. Further dilution was performed to reach final Foscan[®] concentrations of 1.45 μM in RPMI -1640 medium supplemented with 2% FCS for monolayer cell incubation and of 4.5 μM RPMI- 1640 medium supplemented with 10% FCS for spheroid incubation. Injection in animals was performed with a solution of Foscan[®] diluted in a mixture of ethanol, polyethylene glycol and water (2:3:5) as recommended by the manufacturer. Mice were injected in the tail vein with 0.3 mg/kg body weight, 24 h before light exposure.

PDT of HT29 monolayer cells

Four days before treatment, 3×10^4 cells/ml were seeded in 60 mm diameter Petri dishes. Logarithmically growing HT29 cells were incubated with 1 $\mu\text{g/ml}$ (1.45 μM) Foscan[®] solution in RPMI supplemented with 2% FCS for 24 hours. After two washes, RPMI supplemented with 10% FCS was added and cells were irradiated with a 650 nm laser diode at a fluence of 0.03 J cm^{-2} delivered at a fluence rate of 1.92 mW cm^{-2} . Control cells were incubated with Foscan[®] and were not subjected to irradiation (drug, no light). Twenty-four hours after PDT, cells were collected by trypsinisation, washed and fixed in a 4% formaldehyde pH 7.4

PDT of HT29 spheroids

HT29 spheroids were treated according to the method previously published (Marchal et al. 2005). Briefly, after a 24 h incubation with Foscan[®], spheroids were irradiated with a 650 nm laser diode at 5 J cm^{-2} delivered at a fluence rate of 10 mW cm^{-2} . Control spheroids were exposed to Foscan[®] without illumination (drug, no light).

PDT of HT29 xenografted tumour

Twenty-four hours after Foscan® I.V. injection, tumours were irradiated with a 650 nm diode laser at a fluence of 10 J cm^{-2} delivered at a fluence rate of 30 mW cm^{-2} . Control tumours were subjected to Foscan® injection without irradiation (drug, no light).

Assessment of apoptosis

Twenty-four hours after treatments, pellets of monolayer culture cells, spheroids and xenograft samples as well as corresponding control samples were fixed in 4% (m/v) formaldehyde pH 7.4 for 16 h and routinely embedded in paraffin. Additional samples of xenografted tumors from treated animals and controls were snap frozen in liquid nitrogen.

Active caspase-3, active caspase-7 and c-PARP labelling

Immunohistochemical detection of apoptosis-related proteins was carried out on $5\mu\text{m}$ thick deparaffinized sections. Before immunohistochemistry, sections were subjected to heat induced epitope retrieval by incubation in a 0,01M sodium citrate solution pH 6 at 120°C for 10 min followed by a 2 h cool-down. Active caspase-3 was detected with a species-unspecific rabbit polyclonal antibody to the large fragment (17 kD) of the active protein (1/1000 diluted, BD Biosciences, Le Pont-de-Claix, France). The large fragment of active caspase-7 (20 kD) was targeted by a species-unspecific rabbit polyclonal antibody (1/50 diluted) provided by Cell Signaling (Danvers, MA, USA). For c-PARP immunohistochemistry, sections were incubated in a solution of a rabbit polyclonal antibody (clone 19F4, 1/25 diluted, Cell Signaling). This species-specific antibody detects endogenous levels of the large fragment (89 kDa) of human PARP-1 resulting from cleavage at aspartic acid 214 but does not recognize full length PARP-1 or other PARP isoforms. All the antibodies applied in this study were previously used in Western Blot analysis with satisfying results (Marchal et al. 2005; Marchal et al. 2007).

Primary antibodies were applied for 16 h at 4°C. Detection of tissue-bound primary antibodies was performed using the biotinylated secondary antibody/ streptavidin peroxidase detection system. Endogenous peroxidase activity was blocked by a 10 min incubation with 20% hydrogen peroxide after incubation with the biotinylated antibody. Bound peroxidase was identified using the Novared TR system (Vector). Counterstaining was performed with Harris haematoxylin. Negative control was made by processing sections in the absence of primary antibody.

Apoptotic index determination

For the purpose of this study, a caspase-3 labelling index, a caspase-7 labelling index and a c-PARP labelling index were measured. The proportion of apoptotic cells was ascertained by light microscopy (AxiophotII Zeiss, Paris, France) under a x100 oil-immersion lens. In each case, the apoptotic index (AI) was defined as a percentage of stained cells per total number of cells. As the antibody to c-PARP was human specific and did not visualize mouse stromal apoptotic cells whereas the two other techniques stained apoptotic cells both in the stromal and tumour cell compartments, AIs in transplants were assessed by counting only epithelial cells. In sections from cell pellets or xenografts at least 2000 tumour cells were scored. In sections of spheroids, at least three spheroids composed of 300 to 632 non necrotic cells were considered for each treatment condition.

Immunofluorescence labelling and imaging

Demonstration of active caspase-3 and either c-PARP or active caspase-7 in the same section was looked for on 5µm thick, polyethylene glycol (30% in alcohol 95°-v/v-) fixed - frozen sections of xenografted tumors. The reaction steps for each antigen were completed consecutively. Primary antibodies were applied to the sections for 3 h. Detection of primary antibodies was carried with the biotinylated secondary antibody/

streptavidin detection system using streptavidin- Alexa 488 for the first reaction (active caspase-3) and streptavidin Texas red for the second one (c-PARP or active caspase-7). Image acquisition was carried out with a fluorescent microscope (AxiophotII, Zeiss) equipped with a CCD camera (Axiocam HRC, Zeiss). The distribution of each fluorochrome was photographed separately after each step. The Mark and find module of the Axiovision Digital image processing software (Zeiss) was used to record and relocate the various positions on slides photographed after the first step using a motorized XY stage. After photography and prior to incubation with the second antibody, the first staining pattern was eliminated by immersing the sections in a 0.1N HCl for 20 min followed by a PBS wash. Negative control was made by processing sections in the absence of primary antibody. To control first staining elimination, sections were processed without the second primary antibody (c-PARP or active caspase-7).

Statistical analysis

Mann-Whitney's U test was employed to determine the statistical significance with a limit set to $p < 0.05$ using Staviw 5.0 software.

Results

Apoptosis assessment in monolayer cell pellets

Apoptotic cells after immunohistochemistry to active caspase-3 (a), active caspase-7 (b) and c-PARP (c) in Paclitaxel treated HT29 cells were displayed Figure 1. The antibody specific for active caspase-3 (Figure 1a) selectively stained the cytoplasm of cells whose nuclear morphology was consistent with apoptosis as well as the cytoplasm of morphologically healthy-looking cells suggesting that these antibodies recognized activated protein at the early stage of apoptosis. Active caspase-3 was also occasionally detected in nuclei, thus featuring a translocation of the protein to the nucleus whereas

active caspase-7 labelling was only observed in cytoplasm (Figure 1b). In apoptotic cells, whose nuclei were still not fragmented, c-PARP staining (Figure 1c) was limited to nuclear chromatin and was distributed rather uniformly and diffusely over the whole nuclear area.

The AIs obtained from the four markers are displayed in Figure 1d. Overall, in controls less than 4% of the cells were apoptotic. We noticed that c-PARP detection gave a significant lower result as compared with other ones ($AI = 0.09 \pm 0.02$, $p < 0.05$). In Paclitaxel treated cells, c-PARP and active caspase-7 showed a similar rate of apoptosis (respectively 22.7 ± 15.0 and 23.8 ± 3.0) while active caspase-3 labelling yielded slightly but not significantly higher rates of apoptotic cells (30.2 ± 7.6 $p > 0.05$). In Foscan® photosensitised cells, immunohistochemical analysis to active caspase-3, caspase-7 or c-PARP displayed a similar apoptotic rate (respectively 67.1 ± 0.8 , 58.8 ± 18.2 and 68.2 ± 4.7 apoptotic cells).

Apoptosis assessment in spheroids

Immunohistochemistry to active caspase-3, active caspase-7 and c-PARP was applied to HT29 spheroids subjected to different treatment protocols. Figure 2 illustrates the distribution of apoptotic cells labelled with the antibodies to active caspase-3, active caspase-7 and c-PARP, in control spheroids (Figure 2a, b, c respectively), and in spheroids subjected to Foscan®-PDT (Figure 2d, e, f respectively). Control spheroids displayed a few labelled cells around the necrotic core as clearly shown in the spheroid from Figure 2a and c immunostained with either anti-active casp-3 (a) or anti-c-PARP antibody (c). In Foscan® photosensitized spheroids (Figure 2d, e, f), the number of labelled cells increased in the area between the outer rim and the necrotic core. In addition, we noted a loss of cell cohesion. Apoptotic distribution pattern was the same irrespective of the technique used. AIs determined from non-necrotic cells of untreated or

treated either by Paclitaxel or Foscan®-PDT spheroids, were plotted in Figure 2g. In control spheroids, from 9.1% to 17.3% apoptotic cells were counted according to the method applied, with the lowest value for c-PARP ($9.1 \pm 2.3\%$). The highest and identical scores were obtained with active caspase-3 and active caspase-7 ($\pm 17.0\%$) labelling and were found significantly different from c-PARP value ($p < 0.05$). In Paclitaxel treated spheroids and in Foscan®-photosensitized spheroids, immunohistochemistry towards active caspase-3, active caspase-7 and c-PARP, resulted in similar values of AIs (respectively $\pm 33\%$ and $\pm 40.0\%$).

Apoptosis assessment in HT29 subcutaneous xenografts

The density of apoptotic cells was assessed in three control tumours and in seven xenografts twenty-four hours after Foscan®-PDT. The apoptotic indexes in transplants were defined as a percentage of epithelial stained cells per total epithelial number of cells (Figure 3). Variability in the level of apoptosis was patent. Overall, the extent of apoptosis detected with c-PARP in control tumours was significantly lower ($0.2 \pm 0.2\%$) than active caspase-3 or active caspase-7 immunostaining (mean AIs = $1.6 \pm 1.2\%$, $p < 0.05$). In Foscan® photosensitized tumours, active caspase-3 labelling prevailed in all cases. This observation was confirmed by the comparison of AIs averaged for each marker (Table 1). Maximal staining ($8.3 \pm 2.9\%$) was obtained for active caspase-3 vs $\pm 5.0\%$ for active caspase-7 and cleaved-PARP. The difference between these two groups were statistically significant ($p < 0.02$).

Overlaid images taken from immunofluorescence experiments of a tissue section subjected to active caspase-3 (red) and c-PARP (green) in control (Figure 4a) or in Foscan®-photosensitized tumours (Figure 4b) provided similar information. c-PARP co-localized with active-caspase-3. Scarce yellow spots suggesting limited expression of c-PARP were observed in both cases but the number of cells exhibiting tiny yellow spots

was higher in control tumours (Figure 4a). These observation was confirmed by a careful examination of immunostained tissue sections (Figure 4c,d). Many apoptotic cells from control tumours displayed nuclei containing a limited part of labelled antigenic sites (Figure 4c) whereas phototosensitized tumours revealed a higher number of apoptotic cells with a large expression of c-PARP (Figure 4d).

Another observation from immunofluorescence analysis was the poor correlation between active caspase-3 (red) and active caspase-7 (green) labelling (Figure 5) in Foscan® photosensitized tumours. Expression of active caspase-7 (yellow) was not detectable in all active caspase-3 expressing cells (red).

Discussion

Two major apoptotic pathways, namely the extrinsic (through membrane death receptor) and intrinsic (through mitochondria) are governed by caspases, a family of proteases that cleave substrates at Asp-Xxx sequence. Based on their function, caspases have been divided into initiators or executioners of apoptosis. The executioner class includes caspase-3, caspase-6 which is processed by caspase-3 (Slee et al. 2001) and caspase-7. The precise role of caspase-7 during apoptosis remains elusive (Lakhani et al. 2006; Slee et al. 2001) whereas caspase-3 is generally considered to be the primary executioner of apoptosis. Therefore, the development of antibodies targeting either the active form of caspase-3 or cleaved substrates resulting from its activation warrant investigations (Holubec et al. 2005; Jakob et al. 2008).

In the present study, we proposed to extend the investigation to caspase-7 processing and PARP-1 cleavage. Caspases -3 and -7 have some overlapping but also some distinct roles in apoptosis. It has been shown that caspase-3 controls DNA fragmentation and morphologic changes of apoptosis. (Lakhani et al. 2006; Slee et al. 2001). Caspase-7

plays little role in these processes but could be important to the loss of cellular viability (Lakhani et al. 2006). In this context, PARP which is generally recognized as a substrate of both caspases-3 and -7 with a strong affinity for the latter (Germain et al. 1999) could provide a highly useful marker of apoptosis. We performed immunohistochemical investigation of apoptosis at three different levels of pre-clinical models, monolayer cells, cell spheroids that mimic avascular micro-tumours and HT29 tumours xenografted in nude mice. Active caspase-3 immunostaining was confirmed as a high sensitive method that could clearly show the different steps in the location of caspase-3 activation from cytoplasmic to nuclear translocation of the protein. This latter feature was not observed with active caspase-7 which does not translocate into the nucleus after induction of apoptosis (Kamada et al. 2005) thus supporting the difference between the two caspases in their respective role in the nuclear morphological changes during apoptosis. c-PARP labelling in the whole area of apoptotic nuclei (Figure 1c) was anticipated since PARP is a DNA-binding enzyme which signals DNA strand breaks. Moreover, we applied an antibody to the large 85 kDa fragment of c-PARP which has been shown to be translocated from nucleoli to the nucleoplasm during apoptosis whereas the short 29 kDa fragment is retained in nucleoli (Alvarez-Gonzalez et al. 1999). The use of the antibody to c-PARP resulted in a poor detection of apoptotic cells in HT29 cells undergoing physiological apoptosis, as compared with active caspase-3 or -7 labelling (figures 1g, 2g, 3 and Table 1). Further analysis performed by the overlay of immunofluorescence images attributed a high level of co-localization between active caspase-3 and c-PARP in HT29 tumors (figure 4a, b). A similar observation has been related by Puig et al in medulloblastomas (Puig et al. 2001). However, immunofluorescence from c-PARP labelling was restricted to tiny spots (Figure 4) figuring limited expression of antigenic sites that could explain the difficulty to detect

the cleaved form of PARP by enzymatic immunohistochemistry. Following treatment in vitro, either by Paclitaxel or by Foscan®-PDT, the pattern of c-PARP labelling was identical to those of active caspase-3 and -7 (figure 1 and 2) suggesting that cell damage either increases the number of antigenic sites or modifies the expression of PARP cleavage. In fact, both events could be related through the translocation of large PARP fragments from the nucleoli to the nucleoplasm that occurs along with covalently bound poly(ADP-ribose) (Alvarez-Gonzalez et al. 1999). Poly(ADP-ribose) are generated from poly(ADP-ribosyl)ation due to the overactivation of full-length PARP-1 shortly before or simultaneously to the cleavage of PARP by caspases (D'Amours et al. 2001; Germain et al. 1999; Simbulan-Rosenthal et al. 1999). Thus, a relationship between the amount of antigenic sites, the distribution of cleaved fragments over the nucleus and the activity of PARP poly(ADP-ribosyl)ation following treatment could be anticipated. In this context, the rate of c-PARP-labelled apoptotic cells (5.0 ± 2.0 %, table 1) in Foscan® photosensitised HT29 tumours, could represent an accurate evaluation of photoinduced apoptosis whereas apoptotic assessment through caspase-3 or -7 activation includes both basic physiological and treatment-induced apoptosis.

Both treatments, namely Paclitaxel and Foscan®-PDT trigger apoptosis in HT29 cells via the activation of caspases-3 and -7 (Goncalves et al. 2000; Kottke et al. 2002; Marchal et al. 2005). Caspase-7 has been recently presumed to play a major role in the induction of apoptosis under severe oxidative stress of the endoplasmic reticulum (Rao et al. 2004; Reddy et al. 2003). This molecular pathway has been strongly suggested in mammary adenocarcinoma MCF-7 cells treated by Foscan®-PDT (Marchal et al. 2007). Immunohistochemistry to active caspase-3 and active caspase-7 applied on monolayer cells and spheroids treated by either Paclitaxel or Foscan®-PDT revealed an equivalent number of cells expressing caspase-3 or caspase-7 activity (Figure 1d and 2g). Thus,

equal involvement of both caspases in the apoptotic pathway can be presumed. On the other hand, in Foscan® photosensitised tumours active caspase-3 labelling was predominant (Figure 3, Table 1). Co-localization obtained from merged immunofluorescence images indicated that active caspase-7 was not expressed in all caspase-3 expressing-cells (Figure 4c) suggesting that Foscan®-PDT-induced apoptosis was mainly processed through the activation of caspase-3 in HT29 tumours. In conclusion, the use of c-PARP as a marker of physiological apoptosis is doubtful whereas it could be an useful indicator of treatment-induced apoptosis. The biological significance in the different pattern of expression of active caspase-3 and -7 in Foscan® photosensitised tumours requires further investigations. As a general rule, the use of different antibodies to differentiate caspase-dependent apoptotic pathways *in vivo* is relevant.

References

- Alvarez-Gonzalez R, Spring H, Muller M, Burkle A (1999) Selective loss of poly(ADP-ribose) and the 85-kDa fragment of poly(ADP-ribose) polymerase in nucleoli during alkylation-induced apoptosis of HeLa cells. *J Biol Chem* 274:32122-32126
- Banerjee S, Fallis AG, Brown DL (1997) Differential effects of taxol on two human cancer cell lines. *Oncol Res* 9:237-248
- Coutier S, Bezdetnaya LN, Foster TH, Parache RM, Guillemin F (2002) Effect of irradiation fluence rate on the efficacy of photodynamic therapy and tumor oxygenation in meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC)-sensitized HT29 xenografts in nude mice. *Radiat Res* 158:339-345
- D'Amours D, Sallmann FR, Dixit VM, Poirier GG (2001) Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci* 114:3771-3778
- Davidson DJ, Haskell C, Majest S, Kherzai A, Egan DA, Walter KA, Schneider A, Gubbins EF, Solomon L, Chen Z, Lesniewski R, Henkin J (2005) Kringle 5 of human plasminogen induces apoptosis of endothelial and tumor cells through surface-expressed glucose-regulated protein 78. *Cancer Res* 65:4663-4672
- Decker P, Muller S (2002) Modulating poly (ADP-ribose) polymerase activity: potential for the prevention and therapy of pathogenic situations involving DNA damage and oxidative stress. *Curr Pharm Biotechnol* 3:275-283
- Degterev A, Boyce M, Yuan J (2003) A decade of caspases. *Oncogene* 22:8543-8567
- Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EA (2003) Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved

- cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol* 199:221-228
- Germain M, Affar EB, D'Amours D, Dixit VM, Salvesen GS, Poirier GG (1999) Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem* 274:28379-28384
- Goncalves A, Braguer D, Carles G, Andre N, Prevot C, Briand C (2000) Caspase-8 activation independent of CD95/CD95-L interaction during paclitaxel-induced apoptosis in human colon cancer cells (HT29-D4). *Biochem Pharmacol* 60:1579-1584
- Gown AM, Willingham MC (2002) Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J Histochem Cytochem* 50:449-454
- Green DR, Kroemer G (2004) The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 305:626-629
- Holubec H, Payne CM, Bernstein H, Dvorakova K, Bernstein C, Waltmire CN, Warneke JA, Garewal H (2005) Assessment of apoptosis by immunohistochemical markers compared to cellular morphology in ex vivo-stressed colonic mucosa. *J Histochem Cytochem* 53:229-235
- Jakob S, Corazza N, Diamantis E, Kappeler A, Brunner T (2008) Detection of apoptosis in vivo using antibodies against caspase-induced neo-epitopes. *Methods* 44:255-261
- Jin Z, El-Deiry WS (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 4:139-163
- Kamada S, Kikkawa U, Tsujimoto Y, Hunter T (2005) Nuclear translocation of caspase-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein(s). *J Biol Chem* 280:857-860
- Koh DW, Dawson TM, Dawson VL (2005) Mediation of cell death by poly(ADP-ribose) polymerase-1. *Pharmacol Res* 52:5-14
- Kottke TJ, Blajeski AL, Meng XW, Svingen PA, Ruchaud S, Mesner PW, Jr., Boerner SA, Samejima K, Henriquez NV, Chilcote TJ, Lord J, Salmon M, Earnshaw WC, Kaufmann SH (2002) Lack of correlation between caspase activation and caspase activity assays in paclitaxel-treated MCF-7 breast cancer cells. *J Biol Chem* 277:804-815
- Lakhani SA, Masud A, Kuida K, Porter GA, Jr., Booth CJ, Mehal WZ, Inayat I, Flavell RA (2006) Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 311:847-851
- Marchal S, Fadloun A, Maugain E, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L (2005) Necrotic and apoptotic features of cell death in response to Foscan photosensitization of HT29 monolayer and multicell spheroids. *Biochem Pharmacol* 69:1167-1176
- Marchal S, Francois A, Dumas D, Guillemin F, Bezdetnaya L (2007) Relationship between subcellular localisation of Foscan and caspase activation in photosensitised MCF-7 cells. *Br J Cancer* 96:944-951
- Miller JD, Baron ED, Scull H, Hsia A, Berlin JC, McCormick T, Colussi V, Kenney ME, Cooper KD, Oleinick NL (2007) Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 224:290-299
- Mooney LM, Al-Sakkaf KA, Brown BL, Dobson PR (2002) Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. *Br J Cancer* 87:909-917
- Puig B, Tortosa A, Ferrer I (2001) Cleaved caspase-3, caspase-7 and poly (ADP-ribose) polymerase are complementarily but differentially expressed in human medulloblastomas. *Neurosci Lett* 306:85-88

- Pyrko P, Schonthal AH, Hofman FM, Chen TC, Lee AS (2007) The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res* 67:9809-9816
- Rao RV, Ellerby HM, Bredesen DE (2004) Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 11:372-380
- Reddy RK, Mao C, Baumeister P, Austin RC, Kaufman RJ, Lee AS (2003) Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem* 278:20915-20924
- Resendes AR, Majo N, Segales J, Espadamala J, Mateu E, Chianini F, Nofrarias M, Domingo M (2004) Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues. *Vet Immunol Immunopathol* 99:203-213
- Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Iyer S, Boulares H, Smulson ME (1999) Involvement of PARP and poly(ADP-ribosyl)ation in the early stages of apoptosis and DNA replication. *Mol Cell Biochem* 193:137-148
- Slee EA, Adrain C, Martin SJ (2001) Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 276:7320-7326

Table 1 : Quantification of apoptotic cells by immunohistochemistry to c-PARP, active caspase-3 et -7 in paraffin embedded section of control^a and Foscan® photosensitized^b HT29 xenografted tumours

markers	apoptotic index ^d	
	Control tumours	Foscan®-PDT
Active caspase-3	1.4 ± 1.2	8.3 ± 2.9
Active caspase-7	1.4 ± 0.7	4.9 ± 1.5
Cleaved PARP	0.2 ± 0.2	5.0 ± 2.0

^a control tumours were obtained from both untreated HT29 and non irradiated tumours

^b Nude mice were injected with 0.3 mg/kg Foscan® 24 h before tumour irradiation (30 mW cm⁻², 10 J cm⁻²)

^d Mean ± SD of at least three experiments

Legends for Illustrations

Figure 1. Apoptosis detection of HT29 monolayer cells subjected to 0.1 μ M paclitaxel for 48h. Paraffin sections were labelled with (a) active casp-3 antibody. Note nuclear (thin black arrow) or cytoplasmic location (thick black arrow) of active casp-3. (b) active casp-7 antibody. Cytoplasmic location of active casp-7 (black arrow). (c) c-PARP antibody. Note the presence of apoptotic bodies (arrow). Harris' haematoxylin counterstain. Magnification x1000.

(d) Apoptotic index from control or treated with paclitaxel or Foscan®-PDT. ■ active casp-3 and ▨ active casp-7 and □ c-PARP. Results are expressed as mean AI $\pm$ SE of 3 experiments determined from at least 2000 tumour cells in each section..

Figure 2. Immunohistochemistry on paraffin sections of HT29 spheroids to active casp-3 (a,d), active casp-7 (b,e) or cleaved PARP (c,f) applied without treatment (a,b,c) or subjected to Foscan®-PDT (d,e,f). Note the distribution of apoptotic cells at the periphery of necrotic area. Loss of cell cohesion was noticeable in spheroid subjected to Foscan®-PDT (d,e,f). Harris' haematoxylin counterstain. Magnification x200.

(g) Apoptotic index from control spheroids or treated with paclitaxel or Foscan®-PDT. ■ active casp-3 and ▨ active casp-7 and □ c-PARP. Results are expressed as mean AI $\pm$ SE of 3 experiments determined from at least 2000 tumour cells in each section..

Figure 3. Apoptotic index following cleaved PARP immunohistochemistry, active casp-3 or active casp-7 staining, applied on HT29 subcutaneous xenografts subjected to Foscan® (0.3 mg/kg IV) photosensitization (10 Jcm⁻², 30 mWcm⁻², 24h post injection). Note the variability between tumours in the rate of apoptosis. Apoptotic Index were determined from at least 2000 tumour cells in each section.

Figure 4. Overlay of immunofluorescence images obtained from control tumours (a) or Foscan® (0.3 mg/kg IV) photosensitised (10 Jcm⁻², 30 mWcm⁻²) HT29 subcutaneous xenografts (b) frozen 24h after treatment. Frozen sections were first subjected to active casp-3 (red fluorescence) immunohistochemistry then to c-PARP (green fluorescence). Colocalization between both markers displayed large yellow spots (thick white arrows) or tiny yellow spots (thin white arrows) due to c-PARP expression. Magnification x400. c-PARP immunohistochemistry on paraffin sections of control tumours (c) and photosensitised tumours (d). Thin black arrows indicate limited expression of c-PARP whereas a thick black arrow indicates a large expression of c-PARP in nuclei of apoptotic cells. Magnification x1000.

Figure 5. Overlay of immunofluorescence images obtained from Foscan® (0.3 mg/kg IV) photosensitised (10 Jcm⁻², 30 mWcm⁻²). HT29 subcutaneous xenografts frozen 24h after treatment. Frozen sections were first subjected to active casp-3 (red fluorescence) immunohistochemistry then to active casp-7 (green fluorescence). Colocalization between both markers displayed yellow spots (thick arrows). Red spots (thin arrows) indicate active caspase-3 expression only. Magnification x200.

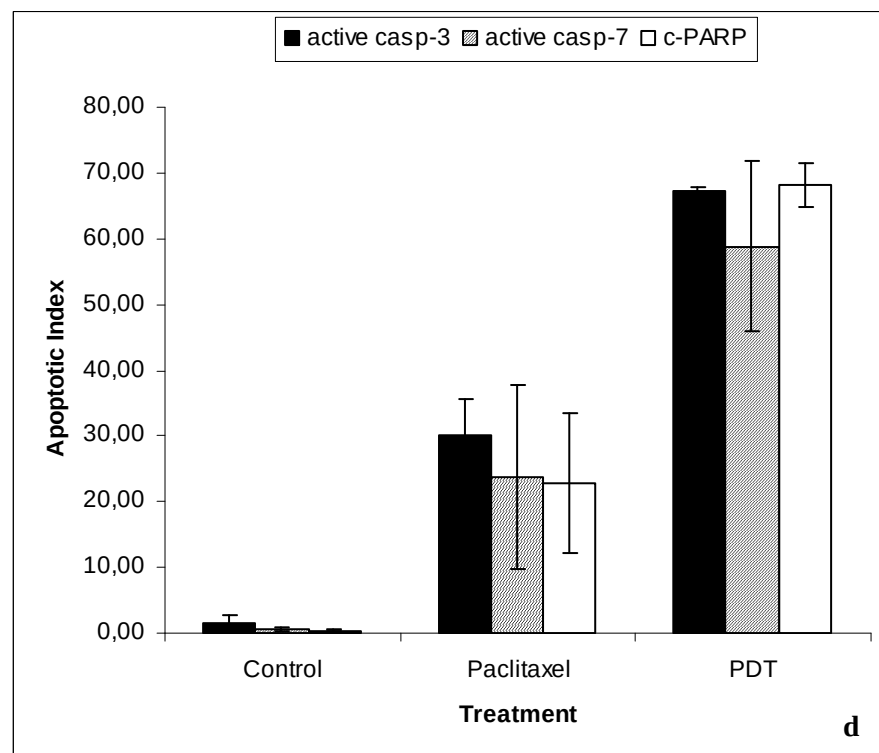
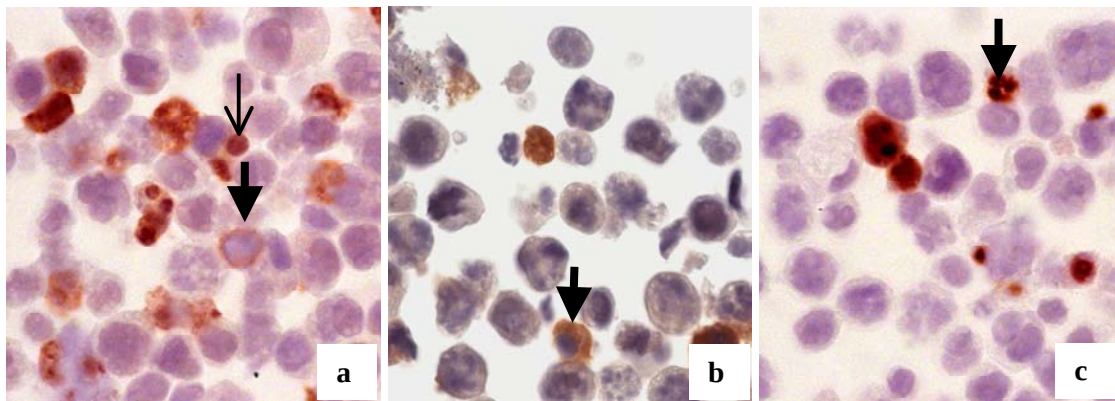


FIGURE 1

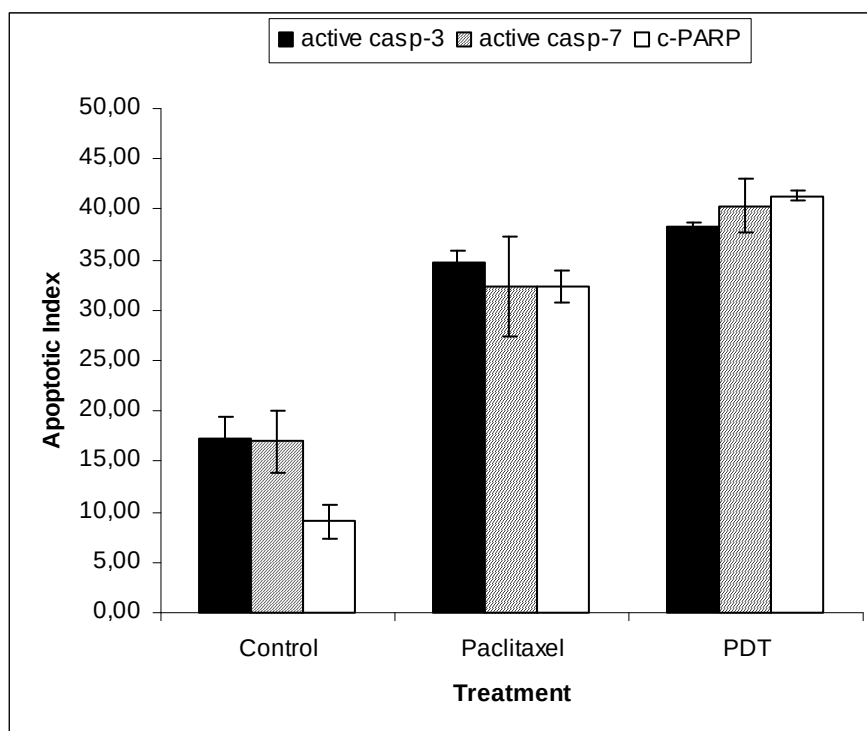
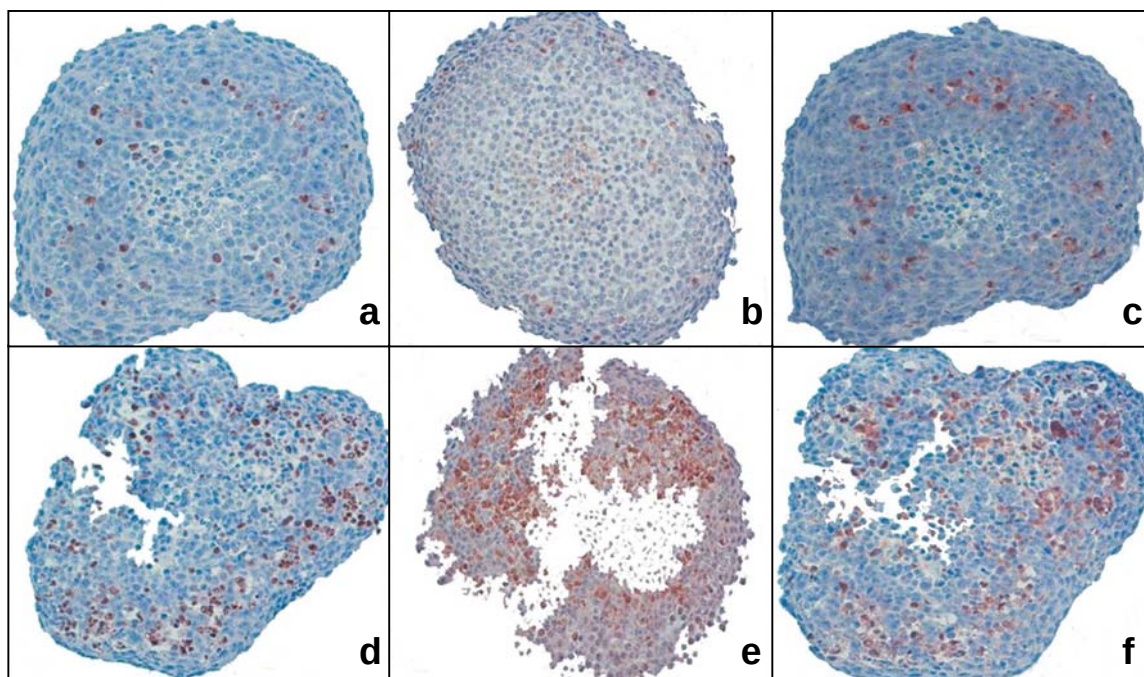


FIGURE 2

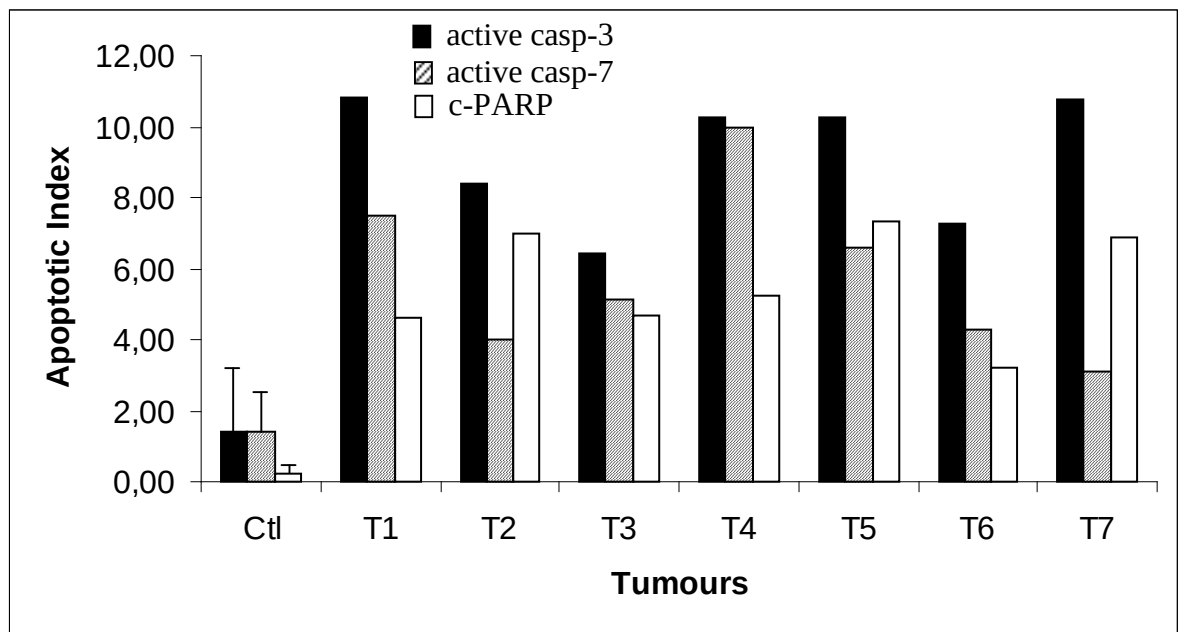


FIGURE 3

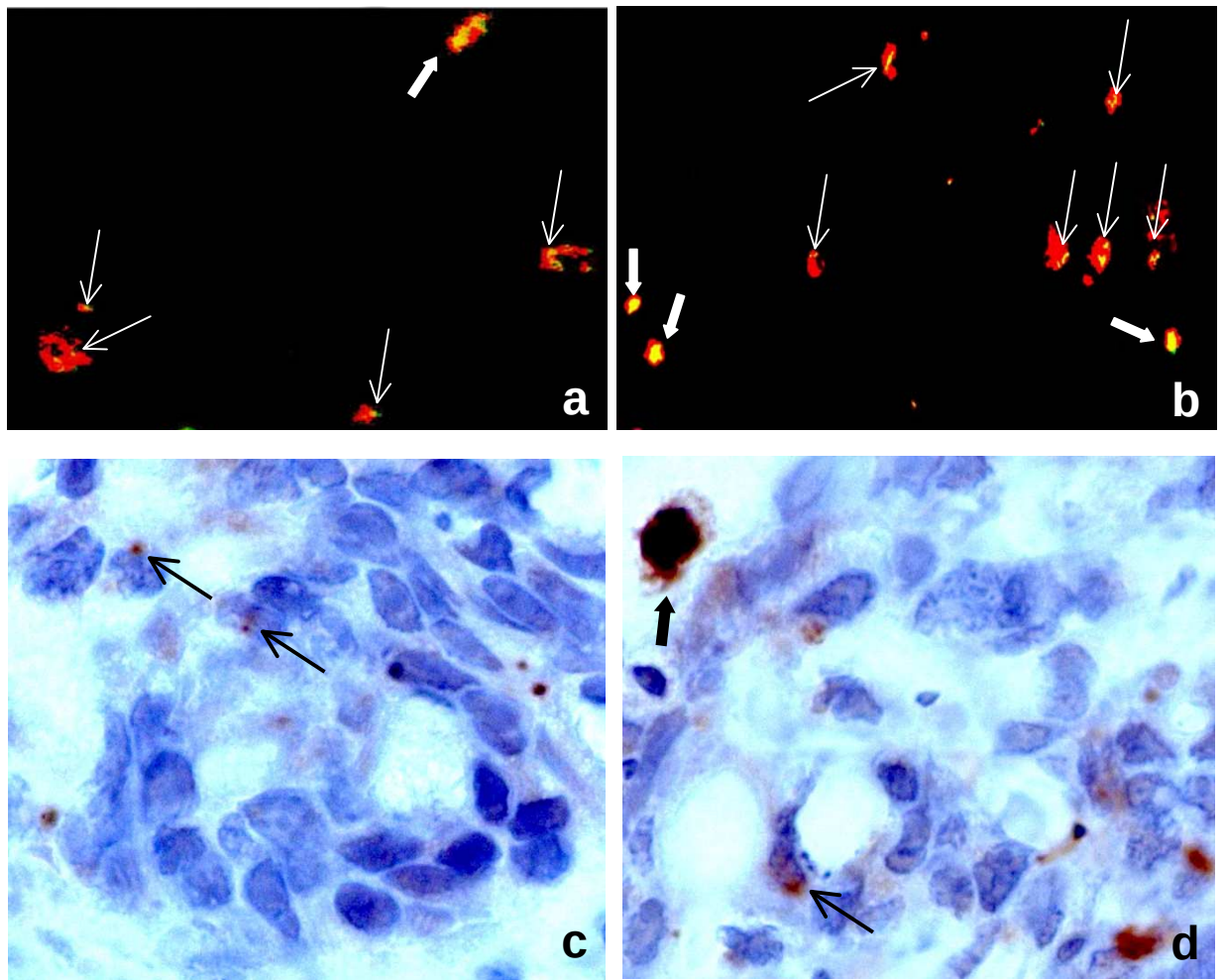


FIGURE 4

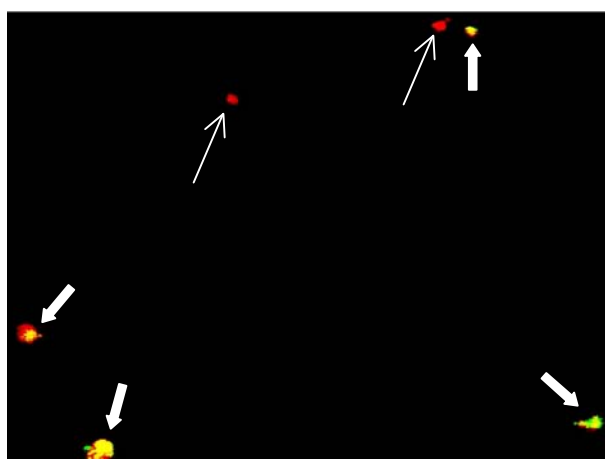


FIGURE 5

SYNTHÈSE GÉNÉRALE DES RÉSULTATS

La thérapie photodynamique, grâce à la combinaison complexe des trois composants qui régissent son activité, le photosensibilisateur, la lumière et l'oxygène, génère la mort cellulaire par un mélange subtil d'effets allant de la mort violente par la lyse collective des cellules (nécrose) à la mort génétiquement programmée par la cellule. La première option présente l'avantage, malgré une réponse inflammatoire intense souvent gênante en clinique, d'activer le système immunitaire et produire une immunité anti-tumorale. La deuxième option essentiellement représentée par l'apoptose a l'avantage de réduire les phénomènes inflammatoires grâce à la phagocytose des cellules apoptotiques. De plus, certaines études montrent que les cellules apoptotiques peuvent être plus efficaces que les cellules nécrotiques pour induire une réponse immune *in vivo* (revue dans Castano et al (256)). Aussi, la valorisation de la mort apoptotique par l'identification des voies de signalisation moléculaires et de leur régulation apparaît comme une stratégie intéressante qui vise à améliorer l'efficacité de la thérapie photodynamique

L'apoptose est une forme majeure de mortalité générée par la plupart des cellules en culture en réponse au traitement par thérapie photodynamique. Cette constatation peut s'expliquer par les dommages directs de la PDT sur la cellule, l'apoptose photoinduite étant fortement dépendante de la localisation subcellulaire du photosensibilisateur. Ainsi, la mitochondrie qui est à la fois le site de localisation de nombreux photosensibilisateurs et le site critique du déroulement de la phase finale de l'apoptose est l'organe clé de l'apoptose photoinduite (169; 171). De ce fait, les événements moléculaires de la voie intrinsèque impliquant la mitochondrie sont considérés comme primordiaux dans le déroulement de l'apoptose induite par la thérapie photodynamique.

Notre première démarche dans ce domaine, suite à la thérapie photodynamique avec le Foscan®, a été basée sur les rares données de la littérature toutes orientées vers les dommages photoinduits de la mitochondrie (110; 113). Nous avons donc cherché à préciser la cinétique des événements mitochondriaux, libération du cytochrome c et dépolarisation de la membrane cytoplasmique, dans des cellules d'adénocarcinome de colon humain HT29 traitées par Foscan®-PDT. Plusieurs doses de lumière conduisant à une photocytotoxicité progressive (60 à 97 % de mort cellulaire) ayant été appliquées,

nous avons mesuré les paramètres de la réponse tumorale ainsi que le pourcentage de cellules nécrotiques et apoptotiques au cours de la même période de temps. Nous avons ainsi montré que dépolarisation de la membrane mitochondriale et libération du cytochrome c étaient deux événements concomitants qui étaient totalement réalisés 24 h après irradiation dans les cellules tuées par la PDT. Ce délai assez long par rapport à la réponse quasi immédiate de la mitochondrie pour les photosensibilisateurs localisés dans cet organite (257) est expliqué par la localisation du Foscan® majoritaire dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi (111) ce qui expliquerait un effet direct de la réaction photodynamique dans la mitochondrie moins important (112). Par contre, l'implication de la mitochondrie dans la mort cellulaire reste évidente puisque, 24h après PDT, la réponse mitochondriale est parfaitement corrélée à la survie cellulaire. Nous avons également montré que la mort cellulaire était principalement due à la nécrose et que l'apoptose n'était pas le processus prédominant dans ces cellules après Foscan®-PDT. Ces résultats confortent l'hypothèse que la mitochondrie n'étant pas le site d'accumulation privilégié du Foscan®, l'apoptose n'est pas le mode de mort cellulaire privilégié après PDT.

Cette constatation a guidé notre réflexion dans l'approche préclinique des paramètres gouvernant l'apoptose induite par Foscan® -PDT. En effet, l'étude réalisée sur cellules en monocouche ne prend pas en compte un paramètre essentiel de l'efficacité de la réaction photodynamique, l'oxygène, celui-ci étant distribué de façon continue et homogène sur la totalité du tapis cellulaire. Des travaux réalisés par notre équipe en collaboration avec l'équipe de Thomas Foster (30; 39) ont montré l'intérêt d'utiliser un modèle tri-dimensionnel de microtumeur non vascularisée, le sphéroïde, dans l'étude spécifique des effets photocytotoxiques directs de la PDT liés à la distribution et à la consommation de l'oxygène.

L'efficacité de la thérapie photodynamique est dépendante du maintien de l'oxygénation garantie par l'application d'irradiances faibles, aussi nous avons constaté que, par rapport aux autres irradiances (30 et 90 mW/cm²), seule l'irradiance la plus faible (10 mW/cm²) produit une photocytotoxicité presque totale dans les sphéroïdes HT29 traités par Foscan®-PDT. A cette irradiance, la mesure de l'activité enzymatique de la caspase-3 a été trouvée significativement augmentée pour une dose de lumière produisant 65 % de photocytotoxicité. Par contre, à 30 mW/cm² et 90 mW/cm² d'irradiance, l'application de doses de lumière produisant la même photocytotoxicité de 65 % n'induit pas d'activation enzymatique de la caspase-3. Ces résultats suggèrent une

modulation de l'apoptose par l'irradiance, ce qui a également été montré *in vivo* par Henderson et al (53). Dans notre modèle, à 10 mW/cm² et à une dose de lumière induisant 96 % de photocytotoxicité, l'activité enzymatique de la caspase-3 n'est plus significative ce qui pourrait signifier, comme dans les cellules en mononcouche, une diminution de l'apoptose en faveur de la nécrose pour les fluences les plus élevées.

Une autre possibilité de moduler l'apoptose est de favoriser l'accumulation des photosensibilisateurs dans les organites les plus répondeurs à l'induction apoptotique. Ainsi, plusieurs études ont montré que la durée d'incubation du photosensibilisateur avec les cellules pouvait modifier la localisation sub-cellulaire et l'apoptose photoinduite (80; 81; 230). La probabilité d'une modification de la réponse apoptotique induite par la PDT avec le Foscan® a été examinée lorsque nous avons observé une modification de l'accumulation du Foscan® dans les organites qui avaient été précédemment identifiés. En effet, l'étude de Teiten et al (111) montre une localisation préférentielle du Foscan® dans le Golgi/RE après 3h d'incubation des cellules avec le photosensibilisateur (111). Après cette durée courte d'incubation suivie par la PDT, nous avons mis en évidence certains événements moléculaires au niveau du RE, de la mitochondrie et des caspases post-mitochondriales de façon à caractériser l'apoptose photoinduite dans ces conditions d'incubation. Nous avons trouvé une induction de la protéine chaperone GRP78 24 h après irradiation ce qui confirme un stress oxydant au niveau du RE. Bien que la mitochondrie ne soit pas le site de localisation principal du Foscan®, la mesure relative du contenu en Foscan® des mitochondries représente environ 1/3 du Foscan® total de la cellule. La réponse mitochondriale, libération du cyt c et dépolarisation de la membrane mitochondriale, est similaire à celle obtenue pour les cellules HT29. Ces événements ont été montrés peu sensibles à l'inhibition de l'insertion de Bax dans la membrane mitochondriale. En effet, en soumettant les cellules à la PDT en les maintenant à une température inférieure à 15°C dans le but d'empêcher la translocation de Bax dans la mitochondrie, nous n'avons pas observé une modification sensible de la dépolarisation de la membrane mitochondriale. Cette observation suggère une perméabilisation membranaire suite à des dommages oxydants directs au niveau de la mitochondrie. L'implication du pore de perméabilité temporaire ayant été précédemment écarté des mécanismes possibles conduisant à la perméabilisation de la membrane mitochondriale (112), le processus conduisant à la libération du cyt c et à la dépolarisation de la membrane mitochondriale reste à être déterminé. L'activation des caspases post-mitochondriales a été observée, 24h après

PDT, principalement caspase-7, la caspase-3 étant absente de ces cellules. Cette activation a été trouvée maximale à LD₉₃ et diminuée à la dose de lumière la plus élevée. Une constatation similaire avait été faite pour l'activation enzymatique de la caspase-3 dans les HT29 après Foscan®-PDT, la LD₉₇ produisant une activité enzymatique de la caspase-3 inférieure à celle obtenue suite à l'application d'une LD₉₀ (258). Ces observations suggèrent une inhibition du processus apoptotique favorisant le processus nécrotique dans des conditions de stress oxydant extrême.

En allongeant la durée de contact entre le Foscan® et les cellules, la cinétique de localisation intracellulaire sur 24h montrent une perte progressive de l'accumulation du photosensibilisateur dans l'appareil de Golgi alors que les profils topographiques pour le RE et la mitochondrie restent inchangés. Vingt-quatre heures après incubation avec le Foscan®, la quantité relative de Foscan® dans les mitochondries est réduite et ne représente plus que 10% de la totalité du Foscan® contenu dans la cellule. L'ensemble de ces observations suggérant un renforcement de la localisation du Foscan® dans le RE, a été confirmé par une augmentation sensible du stress oxydant du RE suite à l'application de doses de lumières cytotoxiques équivalentes à celles utilisées dans le précédent protocole (3h d'incubation). Une induction de GRP78, plus précoce (dès 4h après PDT) et plus intense 24 h après traitement a pu ainsi être observée. Dans le même temps, une diminution de la réponse mitochondriale (libération du cyt c et dépolarisation de la membrane mitochondriale) après PDT a été obtenue, suivie par une activation de caspase-9 diminuée. Cependant, l'activation des caspase-6 et surtout -7 est augmentée ce qui va à l'encontre du schéma classique de la voie mitochondriale où la relation entre libération du cyt c et activation des caspases -9 puis -7 et -6 est clairement établie. Par contre, une bonne corrélation est obtenue entre les augmentations d'expression de GRP78 et de caspase-7 active, établissant ainsi un lien entre stress oxydant du RE et activation de la caspase-7. Dans ce contexte, la possibilité d'un dommage photoinduit de la protéine Bcl-2 favorisant l'apoptose a été examinée. En effet, la protéine Bcl-2 est présente dans la membrane du RE où elle joue un rôle anti-apoptotique (192). Nous avons observé, comme Kessel et al (186), une diminution de l'expression de Bcl-2 immédiatement après PDT dans l'extrait protéique total des cellules mais pas dans l'extrait mitochondrial ce qui signifie un dommage photoinduit de la protéine dans un site autre que la mitochondrie, RE ou membrane nucléaire. Cependant, dans notre système, nous n'avons pas établi de relation entre la diminution d'expression de Bcl-2 et l'augmentation d'activation de caspase-7. L'ensemble de ces

résultats accréditent l'hypothèse d'une activation de la caspase-7 *via* une voie indépendante de la mitochondrie mais dépendante de la voie du stress du RE. Le scénario d'un stress oxydant intense du RE produisant l'activation de caspase-7 suite à la rupture d'un complexe impliquant la procaspase-7 et GRP78 (160; 162) serait alors plausible.

La dernière partie de cette thèse est consacrée à la recherche de marqueurs de l'apoptose pouvant présenter un intérêt, suite à une induction *in vivo* par Foscan®-PDT. L'utilisation de l'anticorps anti-caspase-3 active a été recommandée par Miller et al (65) comme marqueur de l'apoptose dépendante de l'activité de la PDT avec Pc 4, photosensibilisateur majoritairement mitochondrial. Cependant, en considérant la possibilité qu'une voie caspase-7 dépendante du stress du RE soit favorisée après Foscan®-PDT, nous nous sommes également intéressés au marquage de la caspase-7 active ainsi qu'à celui de PARP clivée, PARP étant un substrat à la fois de caspase-7 et de caspase-3. Nos résultats montrent que les cellules HT29 et les sphéroïdes traités par Foscan®-PDT montrent un pourcentage similaire de cellules marquées par les anticorps anti-caspase-3 active ou anti-caspase-7 active ou anti-PARP clivée. Un résultat similaire est obtenu avec un traitement par Paclitaxel ce qui laisse supposer qu'il n'y a pas de spécificité due au traitement par Foscan®-PDT. Dans les tumeurs traitées par Foscan®-PDT, il y a superposition entre marquage anti-caspase-3 active et anti-PARP clivée bien que l'expression de la PARP clivée, souvent restreinte en particulier dans les tumeurs contrôles, soit parfois difficile à détecter. Par contre cette expression augmente dans les tumeurs photosensibilisées ce qui suggère une relation avec l'effet apoptotique dû au traitement. Dans ces tumeurs, certaines cellules positives pour caspase-3 active ne montrent pas de marquage pour caspase-7 active. Il semble donc qu'en présence de caspase-3, la voie caspase-7 n'est pas majoritairement induite *in vivo* dans les tumeurs HT29 photosensibilisées avec le Foscan®.

En résumé, l'ensemble de ces travaux montrent essentiellement la possibilité d'orienter les mécanismes de mort cellulaire vers l'apoptose en manipulant certains paramètres essentiels dans l'efficacité du traitement. La stratégie pro-apoptotique appliquée à la PDT est présentée ici comme une réalité *in vitro* qui semble prometteuse *in vivo*, sans oublier cependant que les conditions optimales de la PDT produisant une cure totale des tumeurs localisées peuvent être différentes des conditions de traitement produisant une stimulation immunitaire anti-tumorale.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nos travaux ont été conduits dans le but de dégager un certain nombre de paramètres pouvant moduler l'apoptose dans la mort cellulaire induite par la thérapie photodynamique avec le Foscan®. Nous pouvons dégager de l'ensemble des données figurant dans cette thèse un certain nombre d'avancées susceptibles d'influer, à terme, sur l'application clinique de ce traitement

La première remarque qui ressort de nos travaux est que, dans les modèles cellulaires d'adénocarcinomes que nous avons employés, la PDT avec le Foscan® induit une apoptose modérée et n'est pas le mode de mort cellulaire prédominant, ceci étant expliqué par la localisation peu mitochondriale du photosensibilisateur.

De cette première remarque découle l'enseignement essentiel de cette thèse qui est la possibilité de favoriser l'apoptose par des conditions de traitement spécifiques. C'est ainsi qu'une approche préclinique utilisant le sphéroïde comme modèle nous a permis de montrer que l'irradiance est un paramètre important pouvant jouer sur l'apoptose, celle-ci étant plus importante lorsque l'oxygénation des tumeurs est préservée. Nous avons également mis en évidence l'augmentation de l'activation de la caspase-7 lorsque la localisation du photosensibilisateur était renforcé dans le RE et que, par conséquent, le stress oxydant du RE était augmenté.

Enfin, nous avons contribué à améliorer certaines connaissances dans le domaine des dommages photoinduits et événements moléculaires de la transduction du signal suite à la thérapie photodynamique avec le Foscan®. Ainsi, nous avons montré que Bcl-2 non mitochondrial est une protéine cible de la PDT avec le Foscan® mais son implication dans l'apoptose reste incertaine. La perméabilisation de la membrane mitochondriale semble peu affectée par l'inhibition de la translocation de Bax et du pore de perméabilité transitoire mais produit une dépolarisation concomitante avec la libération du cyt c. Enfin, nos observations suggèrent l'existence d'une voie d'activation de la caspase-7 indépendante de la mitochondrie et dépendante du stress oxydant du RE bien que cette voie ne semble pas majoritaire en présence de caspase-3.

Perspectives

La suite logique de ces travaux présente deux aspects, l'un moléculaire et l'autre préclinique. Les conséquences moléculaires du stress oxydant du RE induit par Foscan®-PDT demandent à être approfondies à commencer par les dommages primaires photoinduits. Outre Bcl-2, d'autres protéines pourraient être des cibles de l' $^1\text{O}_2$ produit par la PDT avec le Foscan® en particulier au niveau du RE. Les voies moléculaires liées au stress oxydant du RE comme la réponse UPR et la signalisation dépendante du Ca^{2+} méritent d'être examinées. Le rôle des protéines de la famille Bcl-2 en particulier Bax et Bcl-2 reste flou et doit être précisé.

L'impact de l'apoptose dans la mort cellulaire doit être également défini. Les autres modes de mort cellulaire méritent également attention en particulier l'autophagie très dépendante du stress oxydant.

Sur le plan préclinique, le fait que l'apoptose soit dépendante de l'irradiance, donc de l'état d'oxygénation des tissus place l'apoptose et certains événements moléculaires comme des éléments marquants de la réponse cellulaire à l' $^1\text{O}_2$. En effet, certains dommages moléculaires spécifiques comme Bcl-2/RE ou Serca2 ATPase sont des éléments qui permettent d'établir un lien entre la localisation subcellulaire des dommages oxydants dus à l' $^1\text{O}_2$, l'intensité de ces dommages et l'amplitude de la réponse cellulaire en particulier de type apoptotique. A cet égard, les caspases actives pourraient être des marqueurs de la réaction photodynamique. De même, les études sur sphéroïdes devraient permettre d'évaluer les dommages moléculaires primaires photoinduits par l' $^1\text{O}_2$ en fonction de l'état d'oxygénation modulé par l'irradiance.

Enfin, une « cartographie » de l'apoptose dans les tumeurs après PDT peut donner une indication sur les dommages intratissulaires dépendant de la localisation du photosensibilisant dans les tissus. La répartition de l'apoptose au niveau vasculaire (apoptose des cellules endothéliales) ou tumoral peut ainsi contribuer à déterminer les compartiments cibles de la PDT avec le Foscan® en fonction de la distribution du photosensibilisateur dans les tissus au moment de l'irradiation (modulable grâce à l'intervalle drogue-lumière).

REFERENCES

- 1 - Raab, O. Über die wirkung fluoroscierender stoffe auf infusoria. *Z Biol* 1900;39:524-530.
- 2 - Ledoux-Lebard, C. *Annales de l'Institut Pasteur* 1902;16:593-604.
- 3 - von Tappeiner, H. Zur Kenntnis der lichtwirkenden (fluoreszierenden) stoffe. *Dtsch Med Wochenschr* 1904;8:265-269.
- 4 - von Tappeiner, H. Therapeutische versuche mit fluoreszierenden stoffe auf infusorien nach versuchen von Raab. *Munch Med Wochenschr* 1903;50:2042-2044.
- 5 - Hausmann, W. Die sensibilisierende wirkung des hematoporphyrins. *Biochem Z* 1911;30:276-316.
- 6 - Silver, H. Psoriasis vulgaris treated with hematoporphyrin. *Arch Dermatol Syph* 1937;36:1118-1119.
- 7 - Policard, A. Etude sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood. *C R Soc Biol* 1924;91:1423-1424.
- 8 - Figge, F.H.J., Weiland, G.S. & Manganiello, L.J. Cancer détection and therapy, affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. *Proc Soc Exp Biol Med* 1948;68:640-641.
- 9 - Schwartz, S., Absolon, K. & Vermund, H. Some relationships of porphyrins, x-rays and tumors. *Med Bull* 1955;68:7-13.
- 10 - Lipson, R.L. & Baldes, E.J. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. *Arch Dermatol* 1960;82:508-516.
- 11 - Lipson, R.L., Baldes, E.J. & Olsen, A.M. Further evaluation of the use of hematoporphyrin derivative as a new aid for the endoscopic detection of malignant disease. *Chest* 1964;46:676-679.
- 12 - Lipson, R.L., Pratt, J.H., Baldes, E.J. & Dockerty, M.B. Hematoporphyrine derivative for detection of cervical cancer. *Obstet Gynecol* 1964;24:78-84.
- 13 - Dougherty, T.J., Kaufman, J.E., Goldfarb, A., Weishaupt, K.R., Boyle, D. & Mittleman, A. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. *Cancer Res* 1978;38:2628-2635.
- 14 - Dougherty, T.J. An update on photodynamic therapy applications. *J Clin Laser Med Surg* 2002;20:3-7.

- 15 - Foote, C.S. Definition of type I and type II photosensitized oxydation. *Photochem Photobiol* 1991;54:659.
- 16 - Takemura, T., Ohta, N., Nakajima, S. & Sakata, I. Critical importance of the triplet lifetime of photosensitizer in photodynamic therapy of tumor. *Photochem Photobiol* 1989;50:339-44.
- 17 - Halliwell, B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res* 1999;31:261-72.
- 18 - van Lier, J.E. & Spikes, J.D. The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines. *Ciba Found Symp* 1989;146:17-26; discussion 26-32.
- 19 - Calzavara-Pinton, P., Szeimies, R.M. & Ortel, B. (eds). Photodynamic therapy and fluorescence diagnosis in dermatology. Vol 2. 2001; Elsevier: Amsterdam.
- 20 - Redmond, R.W. & Gamlin, J.N. A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules. *Photochem Photobiol* 1999;70:391-475.
- 21 - Redmond, R.W. & Kochevar, I.E. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochem Photobiol* 2006;82:1178-86.
- 22 - 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.
- 23 - Rotomskis, R., Bagdonas, S. & Streckyte, G. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of porphyrins used in tumour therapy. *J Photochem Photobiol B* 1996;33:61-7.
- 24 - Bonnett, R. & Martinez, G. Photobleaching of sensitisers used in photodynamic therapy. *Tetrahedron report number 591* 2001;57:9513-9547.
- 25 - Georgakoudi, I., Nichols, M.G. & Foster, T.H. The mechanism of Photofrin photobleaching and its consequences for photodynamic dosimetry. *Photochem Photobiol* 1997;65:135-44.
- 26 - Hadjur, C., Lange, N., Rebstein, J., Monnier, P., van den Bergh, H. & Wagnières, G. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC. *J Photochem Photobiol B* 1998;45:
- 27 - Moan, J., Juzenas, P. & Bagdonas, S. Degradation and transformation of photosensitizers during light exposure. *Recent Res Devel Photochem Photobiol* 2000;4:121-132.
- 28 - Ma, L., Bagdonas, S. & Moan, J. The photosensitizing effect of the photoproduct of protoporphyrin IX. *J Photochem Photobiol B* 2001;60:108-13.
- 29 - Kogan, B.Y. Nonlinear photodynamic therapy. Saturation of a photochemical dose by photosensitizer bleaching. *Photochem Photobiol Sci* 2003;2:673-6.

- 30 - Coutier, S., Mitra, S., Bezdetnaya, L., Parache, R.M., Georgakoudi, I., Foster, T.H. & Guillemain, F. Effects of fluence rate on cell survival and photobleaching in meta-tetra-(hydroxyphenyl)chlorin-photosensitized Colo 26 multicell tumor spheroids. *Photochem Photobiol* 2001;73:297-303.
- 31 - Dysart, J.S., Singh, G. & Patterson, M.S. Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during mTHPC photodynamic therapy of MLL cells. *Photochem Photobiol* 2005;81:196-205.
- 32 - Henderson, B.W. & Fingar, V.H. Oxygen limitation of direct tumor cell kill during photodynamic treatment of a murine tumor model. *Photochem Photobiol* 1989;49:299-304.
- 33 - Fingar, V.H., Wieman, T.J., Wiehle, S.A. & Cerrito, P.B. The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion. *Cancer Res* 1992;52:4914-21.
- 34 - Henning, J.P., Fournier, R.L. & Hampton, J.A. A transient mathematical model of oxygen depletion during photodynamic therapy. *Radiat Res* 1995;142:221-6.
- 35 - Foster, T.H., Murant, R.S., Bryant, R.G., Knox, R.S., Gibson, S.L. & Hilf, R. Oxygen consumption and diffusion effects in photodynamic therapy. *Radiat Res* 1991;126:296-303.
- 36 - Foster, T.H., Hartley, D.F., Nichols, M.G. & Hilf, R. Fluence rate effects in photodynamic of multicell tumor spheroids. *Cancer Res* 1993;53:1249-1254.
- 37 - Nichols, M.G. & Foster, T.H. Oxygen diffusion and reaction kinetics in the photodynamic therapy of multicell tumour spheroids. *Phys Med Biol* 1994;39:2161-81.
- 38 - Sitnik, T.M., Hampton, J.A. & Henderson, B.W. Reduction of tumour oxygenation during and after photodynamic therapy in vivo: effects of fluence rate. *Br J Cancer* 1998;77:1386-94.
- 39 - Coutier, S., Bezdetnaya, L.N., Foster, T.H., Parache, R.M. & Guillemain, F. Effect of irradiation fluence rate on the efficacy of photodynamic therapy and tumor oxygenation in meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin (mTHPC)-sensitized HT29 xenografts in nude mice. *Radiat Res* 2002;158:339-45.
- 40 - Muller, S., Walt, H., Dobler-Girdziunaite, D., Fiedler, D. & Haller, U. Enhanced photodynamic effects using fractionated laser light. *J Photochem Photobiol B* 1998;42:67-70.
- 41 - Iinuma, S., Schomacker, K.T., Wagnieres, G., Rajadhyaksha, M., Bamberg, M., Momma, T. & Hasan, T. In vivo fluence rate and fractionation effects on tumor response and photobleaching: photodynamic therapy with two photosensitizers in an orthotopic rat tumor model. *Cancer Res* 1999;59:6164-70.

- 42 - Schouwink, H., Ruevekamp, M., Oppelaar, H., van Veen, R., Baas, P. & Stewart, F.A. Photodynamic therapy for malignant mesothelioma: preclinical studies for optimization of treatment protocols. *Photochem Photobiol* 2001;73:410-7.
- 43 - Huang, Z., Chen, Q., Shakil, A., Chen, H., Beckers, J., Shapiro, H. & Hetzel, F.W. Hyperoxygenation enhances the tumor cell killing of photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2003;78:496-502.
- 44 - Chen, B., Pogue, B.W., Goodwin, I.A., O'Hara, J.A., Wilmot, C.M., Hutchins, J.E., Hoopes, P.J. & Hasan, T. Blood flow dynamics after photodynamic therapy with verteporfin in the RIF-1 tumor. *Radiat Res* 2003;160:452-9.
- 45 - Pogue, B.W., O'Hara, J.A., Goodwin, I.A., Wilmot, C.J., Fournier, G.P., Akay, A.R. & Swartz, H. Tumor PO(2) changes during photodynamic therapy depend upon photosensitizer type and time after injection. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2002;132:177-84.
- 46 - Busch, T.M. Local physiological changes during photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 2006;38:494-9.
- 47 - Busch, T.M., Wileyto, E.P., Emanuele, M.J., Del Piero, F., Marconato, L., Glatstein, E. & Koch, C.J. Photodynamic therapy creates fluence rate-dependent gradients in the intratumoral spatial distribution of oxygen. *Cancer Res* 2002;62:7273-9.
- 48 - Wang, H.W., Putt, M.E., Emanuele, M.J., Shin, D.B., Glatstein, E., Yodh, A.G. & Busch, T.M. Treatment-induced changes in tumor oxygenation predict photodynamic therapy outcome. *Cancer Res* 2004;64:7553-61.
- 49 - Niedre, M.J., Yu, C.S., Patterson, M.S. & Wilson, B.C. Singlet oxygen luminescence as an in vivo photodynamic therapy dose metric: validation in normal mouse skin with topical amino-levulinic acid. *Br J Cancer* 2005;92:298-304.
- 50 - Dysart, J.S. & Patterson, M.S. Characterization of Photofrin photobleaching for singlet oxygen dose estimation during photodynamic therapy of MLL cells in vitro. *Phys Med Biol* 2005;50:2597-616.
- 51 - Henderson, B.W., Busch, T.M. & Snyder, J.W. Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms. *Lasers Surg Med* 2006;38:489-93.
- 52 - Wang, H.W., Rickter, E., Yuan, M., Wileyto, E.P., Glatstein, E., Yodh, A. & Busch, T.M. Effect of photosensitizer dose on fluence rate responses to photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2007;83:1040-8.
- 53 - Henderson, B.W., Gollnick, S.O., Snyder, J.W., Busch, T.M., Kousis, P.C., Cheney, R.T. & Morgan, J. Choice of oxygen-conserving treatment regimen determines inflammatory response and outcome of photodynamic therapy of tumors. *Cancer Res* 2004;64:2120-2126.

- 54 - Snyder, J.W., Greco, W.R., Bellnier, D.A., Vaughan, L. & Henderson, B.W. Photodynamic therapy: a means to enhanced drug delivery to tumors. *Cancer Res* 2003;63:8126-31.
- 55 - Sitnik, T.M. & Henderson, B.W. The effect of fluence rate on tumor and normal tissue responses to photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 1998;67:462-6.
- 56 - Ericson, M.B., Sandberg, C., Stenquist, B., Gudmundson, F., Karlsson, M., Ros, A.M., Rosen, A., Larko, O., Wennberg, A.M. & Rosdahl, I. Photodynamic therapy of actinic keratosis at varying fluence rates: assessment of photobleaching, pain and primary clinical outcome. *Br J Dermatol* 2004;151:1204-12.
- 57 - Bisland, S.K., Lilge, L., Lin, A., Rusnov, R. & Wilson, B.C. Metronomic photodynamic therapy as a new paradigm for photodynamic therapy: rationale and preclinical evaluation of technical feasibility for treating malignant brain tumors. *Photochem Photobiol* 2004;80:22-30.
- 58 - Chen, B., Pogue, B.W., Hoopes, P.J. & Hasan, T. Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2006;16:279-305.
- 59 - Otsu, K., Sato, K., Ikeda, Y., Imai, H., Nakagawa, Y., Ohba, Y. & Fujii, J. An abortive apoptotic pathway induced by singlet oxygen is due to the suppression of caspase activation. *Biochem J* 2005;389:197-206.
- 60 - Fingar, V.H., Taber, S.W., Haydon, P.S., Harrison, L.T., Kempf, S.J. & Wieman, T.J. Vascular damage after photodynamic therapy of solid tumors: a view and comparison of effect in pre-clinical and clinical models at the University of Louisville. *In Vivo* 2000;14:93-100.
- 61 - Korbelik, M., Krosl, G., Krosl, J. & Dougherty, G.J. The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy. *Cancer Res* 1996;56:5647-52.
- 62 - Bonnett, R., White, R.D., Winfield, U.-J. & Berenbaum, M. Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumor photosensitizers. *Biochem. J.* 1989;261:277-280.
- 63 - Calzavara-Pinton, P.G., Venturini, M. & Sala, R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007;21:293-302.
- 64 - Nyman, E.S. & Hynninen, P.H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2004;73:1-28.
- 65 - Miller, J.D., Baron, E.D., Scull, H., Hsia, A., Berlin, J.C., McCormick, T., Colussi, V., Kenney, M.E., Cooper, K.D. & Oleinick, N.L. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;224:290-9.

- 66 - Calzavara-Pinton, P.G., Venturini, M. & Sala, R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 2: Clinical results. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2007;21:439-51.
- 67 - Lui, H., Hobbs, L., Tope, W.D., Lee, P.K., Elmets, C., Provost, N., Chan, A., Neyndorff, H., Su, X.Y., Jain, H., Hamzavi, I., McLean, D. & Bissonnette, R. Photodynamic therapy of multiple nonmelanoma skin cancers with verteporfin and red light-emitting diodes: two-year results evaluating tumor response and cosmetic outcomes. *Arch Dermatol* 2004;140:26-32.
- 68 - Kamuhabwa, A., Agostinis, P., Ahmed, B., Landuyt, W., van Cleynebreugel, B., van Poppel, H. & de Witte, P. Hypericin as a potential phototherapeutic agent in superficial transitional cell carcinoma of the bladder. *Photochem Photobiol Sci* 2004;3:772-80.
- 69 - Pandey, R.K., Goswami, L.N., Chen, Y., Gryshuk, A., Missert, J.R., Oseroff, A. & Dougherty, T.J. Nature: a rich source for developing multifunctional agents. Tumor-imaging and photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 2006;38:445-67.
- 70 - Konan, Y.N., Gurny, R. & Allemann, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2002;66:89-106.
- 71 - Peng, Q., Moan, J. & Nesland, J.M. Correlation of subcellular and intratumoral photosensitizer localization with ultrastructural features after photodynamic therapy. *Ultrastruct Pathol* 1996;20:109-129.
- 72 - Kessel, D., Luo, Y., Deng, Y. & Chang, C.K. The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 1997;65:422-6.
- 73 - Kessel, D., Luguya, R. & Vicente, M.G. Localization and photodynamic efficacy of two cationic porphyrins varying in charge distributions. *Photochem Photobiol* 2003;78:431-5.
- 74 - Kessel, D. & Luo, Y. Photodynamic therapy: a mitochondrial inducer of apoptosis. *Cell Death Differ* 1999;6:28-35.
- 75 - Trivedi, N.S., Wang, H.W., Nieminen, A.L., Oleinick, N.L. & Izatt, J.A. Quantitative analysis of Pc 4 localization in mouse lymphoma (LY-R) cells via double-label confocal fluorescence microscopy. *Photochem Photobiol* 2000;71:634-9.
- 76 - Chen, L.B. Mitochondrial membrane potential in living cells. *Annu Rev Cell Biol* 1988;4:155-81.
- 77 - Morris, R.L., Azizuddin, K., Lam, M., Berlin, J., Nieminen, A.L., Kenney, M.E., Samia, A.C., Burda, C. & Oleinick, N.L. Fluorescence resonance energy transfer reveals a binding site of a photosensitizer for photodynamic therapy. *Cancer Res* 2003;63:5194-7.
- 78 - Verma, A., Facchina, S.L., Hirsch, D.J., Song, S.Y., Dillahey, L.F., Williams, J.R. & Snyder, S.H. Photodynamic tumor therapy: mitochondrial benzodiazepine receptors as a therapeutic target. *Mol Med* 1998;4:40-5.

- 79 - Siboni, G., Weitman, H., Freeman, D., Mazur, Y., Malik, Z. & Ehrenberg, B. The correlation between hydrophilicity of hypericins and helianthrone: internalization mechanisms, subcellular distribution and photodynamic action in colon carcinoma cells. *Photochem Photobiol Sci* 2002;1:483-91.
- 80 - Hsieh, Y.-J., Wu, C.-C., Chang, C.-J. & Yu, J.-S. Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *J Cell Physiol* 2003;194:363-375.
- 81 - Fabris, C., Valduga, G., Miotto, G., Borsetto, L., Jori, G., Garbisa, S. & Reddi, E. Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res* 2001;61:7495-500.
- 82 - Kessel, D. Relocalization of cationic porphyrins during photodynamic therapy. *Photochem Photobiol Sci* 2002;1:837-40.
- 83 - Berg, K., Madslien, K., Bommer, J.C., Oftebro, R., Winkelman, J.W. & Moan, J. Light induced relocalization of sulfonated meso-tetraphenylporphines in NHIK 3025 cells and effects of dose fractionation. *Photochem Photobiol* 1991;53:203-10.
- 84 - Kessel, D., Conley, M., Vicente, M.G. & Reiners, J.J. Studies on the subcellular localization of the porphycene CPO. *Photochem Photobiol* 2005;81:569-72.
- 85 - Mitra, S., Maugain, E., Bolotine, L., Guillemain, F. & Foster, T.H. Temporally and spatially heterogeneous distribution of mTHPC in a murine tumor observed by two-color confocal fluorescence imaging and spectroscopy in a whole-mount model. *Photochem Photobiol* 2005;81:1123-30.
- 86 - Mitra, S. & Foster, T.H. Photophysical parameters, photosensitizer retention and tissue optical properties completely account for the higher photodynamic efficacy of meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin vs Photofrin. *Photochem Photobiol* 2005;81:849-59.
- 87 - D'Cruz, A., Robinson, M.H. & Biel, M.A. mTHPC-mediated photodynamic therapy in patients with advanced, incurable head and neck cancer: a multicenter study of 128 patients. *Head Neck* 2004;26:232-240.
- 88 - Copper, M.P., Tan, I.B., Oppelaar, H., Ruevekamp, M.C. & Stewart, F.A. Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin photodynamic therapy in early-stage squamous cell carcinoma of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2003;129:709-11.
- 89 - Campbell, S.M., Gould, D.J., Salter, L., Clifford, T. & Curnow, A. Photodynamic therapy using meta-tetrahydroxyphenylchlorin (Foscan) for the treatment of vulval intraepithelial neoplasia. *Br J Dermatol* 2004;151:1076-1080.
- 90 - Lovat, L.B., Jamieson, N.F., Novelli, M.R., Mosse, C.A., Selvasakar, C., Mackenzie, G.D., Thorpe, S.M. & Bown, S.G. Photodynamic therapy with m-

- tetrahydroxyphenyl chlorin for high grade dysplasia and early cancer in Barrett's columnar lined esophagus. *Gastrointest Endosc* 2005;62:617-23.
- 91 - Triesscheijn, M., Ruevekamp, M., Antonini, N., Neering, H., Stewart, F.A. & Baas, P. Optimizing meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin-mediated photodynamic therapy for basal cell carcinoma. *Photochem Photobiol* 2006;82:1686-90.
- 92 - Ayaru, L., Bown, S.G. & Pereira, S.P. Photodynamic therapy for pancreatic and biliary tract carcinoma. *Int J Gastrointest Cancer* 2005;35:1-13.
- 93 - Pereira, S.P., Ayaru, L., Rogowska, A., Mosse, A., Hatfield, A.R. & Bown, S.G. Photodynamic therapy of malignant biliary strictures using meso-tetrahydroxyphenylchlorin. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007;19:479-85.
- 94 - Moore, C.M., Nathan, T.R., Lees, W.R., Mosse, C.A., Freeman, A., Emberton, M. & Bown, S.G. Photodynamic therapy using meso tetra hydroxy phenyl chlorin (mTHPC) in early prostate cancer. *Lasers Surg Med* 2006;38:356-63.
- 95 - Nathan, T.R., Whitelaw, D.E., Chang, S.C., Lees, W.R., Ripley, P.M., Payne, H., Jones, L., Parkinson, M.C., Emberton, M., Gillams, A.R., Mundy, A.R. & Bown, S.G. Photodynamic therapy for prostate cancer recurrence after radiotherapy: a phase I study. *J Urol* 2002;168:1427-32.
- 96 - Veenhuizen, R., Oppelaar, H., Ruevekamp, M., Schellens, J., Dalesio, O. & Stewart, F. Does tumour uptake of Foscan determine PDT efficacy? *Int J Cancer* 1997;73:236-9.
- 97 - Triesscheijn, M., Ruevekamp, M., Aalders, M., Baas, P. & Stewart, F.A. Outcome of mTHPC mediated photodynamic therapy is primarily determined by the vascular response. *Photochem Photobiol* 2005;81:1161-7.
- 98 - Jones, H.J., Vernon, D.I. & Brown, S.B. Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan) in vivo: correlation with pharmacokinetics. *Br J Cancer* 2003;89:398-404.
- 99 - Triesscheijn, M., Ruevekamp, M., Out, R., Van Berkel, T.J., Schellens, J., Baas, P. & Stewart, F.A. The pharmacokinetic behavior of the photosensitizer meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin in mice and men. *Cancer Chemother Pharmacol* 2007;60:113-22.
- 100 - Hopkinson, H.J., Vernon, D.I. & Brown, S.B. Identification and partial characterization of an unusual distribution of the photosensitizer meta-tetrahydroxyphenyl chlorin (temoporphin) in human plasma. *Photochem Photobiol* 1999;69:482-8.
- 101 - Sasnouski, S., Zorin, V., Khludeyev, I., D'Hallewin, M.A., Guillemain, F. & Bezdetnaya, L. Investigation of Foscan interactions with plasma proteins. *Biochim Biophys Acta* 2005;1725:394-402.

- 102 - Sasnouski, S., Kachatkou, D., Zorin, V., Guillemin, F. & Bezdetnaya, L. Redistribution of Foscan from plasma proteins to model membranes. *Photochem Photobiol Sci* 2006;5:770-7.
- 103 - Ronn, A.M., Batti, J., Lee, C.J., Yoo, D., Siegel, M.E., Nouri, M., Lofgren, L.A. & Steinberg, B.M. Comparative biodistribution of meta-Tetra(Hydroxyphenyl) chlorin in multiple species: clinical implications for photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 1997;20:437-42.
- 104 - Cramers, P., Ruevekamp, M., Oppelaar, H., Dalesio, O., Baas, P. & Stewart, F.A. Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy. *Br J Cancer* 2003;88:283-90.
- 105 - Ma, L., Moan, J. & Berg, K. Evaluation of a new photosensitizer, meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin, for use in photodynamic therapy: a comparison of its photobiological properties with those of two other photosensitizers. *Int. J. Cancer* 1994;57:883-888.
- 106 - Klein, S.D., Walt, H. & Richter, C. Photosensitization of isolated rat liver mitochondria by tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin. *Arch Biochem Biophys* 1997;348:313-319.
- 107 - Melnikova, V.O., Bezdetnaya, L.N., Potapenko, A.Y. & Guillemin, F. Photodynamic properties of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin in human tumor cells. *Radiat Res* 1999;152:428-435.
- 108 - Van Geel, I.P., Oppelaar, H., Marijnissen, J.P. & Stewart, F.A. Influence of fractionation and fluence rate in photodynamic therapy with Photofrin or mTHPC. *Radiat Res* 1996;145:602-609.
- 109 - Blant, S.A., Woodtli, A., Wagnières, G., Fontollet, C., van den Bergh, H. & Monnier, P. In vivo fluence rate effect in photodynamic therapy of early cancer with tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin. *Photochem Photobiol* 1996;64:963-968.
- 110 - Chen, J.Y., Mak, N.K., Yow, C.M., Fung, M.C., Chiu, L.C., Leung, W.N. & Cheung, N.H. The binding characteristics and intracellular localization of temoporfin (mTHPC) in myeloid leukemia cells: phototoxicity and mitochondrial damage. *Photochem Photobiol* 2000;72:541-7.
- 111 - Teiten, M.H., Bezdetnaya, L., Morlière, P., Santus, R. & Guillemin, F. Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan[®] localization in cultured tumor cells. *Br J Cancer* 2003;88:146-152.
- 112 - Teiten, M.H., Marchal, S., D'Hallewin, M.A., Guillemin, F. & Bezdetnaya, L. Primary photodamage sites and mitochondrial events after Foscan photosensitization of MCF-7 human breast cancer cells. *Photochem Photobiol* 2003;78:9-14.
- 113 - Yow, C.M., Chen, J.Y., Mak, N.K., Cheung, N.H. & Leung, A.W. Cellular uptake, subcellular localization and photodamaging effect of temoporfin (mTHPC) in

- nasopharyngeal carcinoma cells: comparison with hematoporphyrin derivative. *Cancer Lett* 2000;157:123-31.
- 114 - Foster, T.H., Pearson, B.D., Mitra, S. & Bigelow, C.E. Fluorescence anisotropy imaging reveals localization of mesotetrahydroxylphenyl chlorin in the nuclear envelope. *Photochem Photobiol* 2005;81:1544-1547.
- 115 - Leung, W.N., Sun, X., Mak, N.K. & Yow, C.M. Photodynamic effects of mTHPC on human colon adenocarcinoma cells: photocytotoxicity, subcellular localization and apoptosis. *Photochem Photobiol* 2002;75:406-11.
- 116 - Chen, J.Y., Mak, N.K., Wen, J.M., Leung, W.N., Chen, S.C., Fung, M.C. & Cheung, N.H. A comparison of the photodynamic effects of temoporfin (mTHPC) and MC540 on leukemia cells: efficacy and apoptosis. *Photochem Photobiol* 1998;68:545-54.
- 117 - Thibaut, S., Bourre, L., Hernot, D., Rousset, N., Lajat, Y. & Patrice, T. Effects of BAPTA-AM, Forskolin, DSF and Z.VAD.fmk on PDT-induced apoptosis and m-THPC phototoxicity on B16 cells. *Apoptosis* 2002;7:99-106.
- 118 - Triesscheijn, M., Ruevekamp, M., Aalders, M., Baas, P. & Stewart, F.A. Comparative sensitivity of microvascular endothelial cells, fibroblasts and tumor cells after in vitro photodynamic therapy with meso-tetra-hydroxyphenyl-chlorin. *Photochem Photobiol* 2004;80:236-41.
- 119 - Lilge, L., Portnoy, M. & Wilson, B.C. Apoptosis induced in vivo by photodynamic therapy in normal brain and intracranial tumour tissue. *Br J Cancer* 2000;83:1110-1117.
- 120 - Kerr, J.F., Wyllie, A.H. & Currie, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972;26:239-57.
- 121 - Jin, Z. & El-Deiry, W.S. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 2005;4:139-63.
- 122 - Lavrik, I.N., Golks, A. & Krammer, P.H. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005;115:2665-72.
- 123 - Degterev, A., Boyce, M. & Yuan, J. A decade of caspases. *Oncogene* 2003;22:8543-67.
- 124 - Guerrero, A.D., Chen, M. & Wang, J. Delineation of the caspase-9 signaling cascade. *Apoptosis* 2007;13:177-86.
- 125 - Li, H., Zhu, H., Xu, C.J. & Yuan, J. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 1998;94:491-501.
- 126 - Slee, E.A., Adrain, C. & Martin, S.J. Executioner caspase-3, -6, and -7 perform distinct, non-redundant roles during the demolition phase of apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:7320-6.

- 127 - Schutte, B., Henfling, M., Kolgen, W., Bouman, M., Meex, S., Leers, M.P., Nap, M., Bjorklund, V., Bjorklund, P., Bjorklund, B., Lane, E.B., Omary, M.B., Jornvall, H. & Ramaekers, F.C. Keratin 8/18 breakdown and reorganization during apoptosis. *Exp Cell Res* 2004;297:11-26.
- 128 - Lakhani, S.A., Masud, A., Kuida, K., Porter, G.A., Jr., Booth, C.J., Mehal, W.Z., Inayat, I. & Flavell, R.A. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. *Science* 2006;311:847-51.
- 129 - Jang, M., Park, B.C., Lee, A.Y., Na, K.S., Kang, S., Bae, K.H., Myung, P.K., Chung, B.C., Cho, S., Lee do, H. & Park, S.G. Caspase-7 mediated cleavage of proteasome subunits during apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2007;363:388-94.
- 130 - Germain, M., Affar, E.B., D'Amours, D., Dixit, V.M., Salvesen, G.S. & Poirier, G.G. Cleavage of automodified poly(ADP-ribose) polymerase during apoptosis. Evidence for involvement of caspase-7. *J Biol Chem* 1999;274:28379-84.
- 131 - Tang, D. & Kidd, V.J. Cleavage of DFF-45/ICAD by multiple caspases is essential for its function during apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:28549-52.
- 132 - Widlak, P. & Garrard, W.T. Discovery, regulation, and action of the major apoptotic nucleases DFF40/CAD and endonuclease G. *J Cell Biochem* 2005;94:1078-87.
- 133 - Kivinen, K., Kallajoki, M. & Taimen, P. Caspase-3 is required in the apoptotic disintegration of the nuclear matrix. *Exp Cell Res* 2005;311:62-73.
- 134 - Kagawa, S., Gu, J., Honda, T., McDonnell, T.J., Swisher, S.G., Roth, J.A. & Fang, B. Deficiency of caspase-3 in MCF7 cells blocks Bax-mediated nuclear fragmentation but not cell death. *Clin Cancer Res* 2001;7:1474-80.
- 135 - Janicke, R.U., Sprengart, M.L., Wati, M.R. & Porter, A.G. Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 1998;273:9357-60.
- 136 - Liang, Y., Yan, C. & Schor, N.F. Apoptosis in the absence of caspase 3. *Oncogene* 2001;20:6570-8.
- 137 - Mooney, L.M., Al-Sakkaf, K.A., Brown, B.L. & Dobson, P.R. Apoptotic mechanisms in T47D and MCF-7 human breast cancer cells. *Br J Cancer* 2002;87:909-17.
- 138 - Zheng, T.S., Hunot, S., Kuida, K., Momoi, T., Srinivasan, A., Nicholson, D.W., Lazebnik, Y. & Flavell, R.A. Deficiency in caspase-9 or caspase-3 induces compensatory caspase activation. *Nat Med* 2000;6:1241-7.
- 139 - Shibue, T. & Taniguchi, T. BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int J Cancer* 2006;119:2036-43.

- 140 - Willis, S.N. & Adams, J.M. Life in the balance: how BH3-only proteins induce apoptosis. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:617-25.
- 141 - Lalier, L., Cartron, P.F., Juin, P., Nedelkina, S., Manon, S., Bechinger, B. & Vallette, F.M. Bax activation and mitochondrial insertion during apoptosis. *Apoptosis* 2007;12:887-96.
- 142 - Rasola, A. & Bernardi, P. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 2007;12:815-33.
- 143 - Wei, M.C., Zong, W.X., Cheng, E.H., Lindsten, T., Panoutsakopoulou, V., Ross, A.J., Roth, K.A., MacGregor, G.R., Thompson, C.B. & Korsmeyer, S.J. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science* 2001;292:727-30.
- 144 - Garrido, C., Galluzzi, L., Brunet, M., Puig, P.E., Didelot, C. & Kroemer, G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ* 2006;13:1423-33.
- 145 - Hajnoczky, G., Csordas, G., Das, S., Garcia-Perez, C., Saotome, M., Sinha Roy, S. & Yi, M. Mitochondrial calcium signalling and cell death: approaches for assessing the role of mitochondrial Ca²⁺ uptake in apoptosis. *Cell Calcium* 2006;40:553-60.
- 146 - Antignani, A. & Youle, R.J. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol* 2006;18:685-9.
- 147 - Zhou, H., Hou, Q., Chai, Y. & Hsu, Y.T. Distinct domains of Bcl-XL are involved in Bax and Bad antagonism and in apoptosis inhibition. *Exp Cell Res* 2005;309:316-28.
- 148 - Kim, R. Unknotting the roles of Bcl-2 and Bcl-xL in cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;333:336-43.
- 149 - Chipuk, J.E., Bouchier-Hayes, L., Kuwana, T., Newmeyer, D.D. & Green, D.R. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science* 2005;309:1732-5.
- 150 - Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M. & Shore, G.C. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene* 2003;22:8608-18.
- 151 - Ferri, K.F. & Kroemer, G. Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 2001;3:E255-63.
- 152 - Danial, N.N. & Korsmeyer, S.J. Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116:205-19.
- 153 - Lai, E., Teodoro, T. & Volchuk, A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response. *Physiology (Bethesda)* 2007;22:193-201.

- 154 - Tan, Y., Dourdin, N., Wu, C., De Veyra, T., Elce, J.S. & Greer, P.A. Ubiquitous calpains promote caspase-12 and JNK activation during endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2006;281:16016-24.
- 155 - Rao, R.V., Peel, A., Logvinova, A., del Rio, G., Hermel, E., Yokota, T., Goldsmith, P.C., Ellerby, L.M., Ellerby, H.M. & Bredesen, D.E. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program: role of the ER chaperone GRP78. *FEBS Lett* 2002;514:122-8.
- 156 - Rao, R.V., Ellerby, H.M. & Bredesen, D.E. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. *Cell Death Differ* 2004;11:372-80.
- 157 - Rao, R.V., Castro-Obregon, S., Frankowski, H., Schuler, M., Stoka, V., del Rio, G., Bredesen, D.E. & Ellerby, H.M. Coupling endoplasmic reticulum stress to the cell death program. An Apaf-1-independent intrinsic pathway. *J Biol Chem* 2002;277:21836-42.
- 158 - Saleh, M., Mathison, J.C., Wolinski, M.K., Bensinger, S.J., Fitzgerald, P., Droin, N., Ulevitch, R.J., Green, D.R. & Nicholson, D.W. Enhanced bacterial clearance and sepsis resistance in caspase-12-deficient mice. *Nature* 2006;440:1064-8.
- 159 - Reddy, R.K., Mao, C., Baumeister, P., Austin, R.C., Kaufman, R.J. & Lee, A.S. Endoplasmic reticulum chaperone protein GRP78 protects cells from apoptosis induced by topoisomerase inhibitors: role of ATP binding site in suppression of caspase-7 activation. *J Biol Chem* 2003;278:20915-24.
- 160 - Wu, Y., Zhang, H., Dong, Y., Park, Y.M. & Ip, C. Endoplasmic reticulum stress signal mediators are targets of selenium action. *Cancer Res* 2005;65:9073-9.
- 161 - Pyrko, P., Schonthal, A.H., Hofman, F.M., Chen, T.C. & Lee, A.S. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP as a novel target for increasing chemosensitivity in malignant gliomas. *Cancer Res* 2007;67:9809-16.
- 162 - Davidson, D.J., Haskell, C., Majest, S., Kherzai, A., Egan, D.A., Walter, K.A., Schneider, A., Gubbins, E.F., Solomon, L., Chen, Z., Lesniewski, R. & Henkin, J. Kringle 5 of human plasminogen induces apoptosis of endothelial and tumor cells through surface-expressed glucose-regulated protein 78. *Cancer Res* 2005;65:4663-72.
- 163 - Nutt, L.K., Chandra, J., Pataer, A., Fang, B., Roth, J.A., Swisher, S.G., O'Neil, R.G. & McConkey, D.J. Bax-mediated Ca²⁺ mobilization promotes cytochrome c release during apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:20301-8.
- 164 - Hacki, J., Egger, L., Monney, L., Conus, S., Rosse, T., Fellay, I. & Borner, C. Apoptotic crosstalk between the endoplasmic reticulum and mitochondria controlled by Bcl-2. *Oncogene* 2000;19:2286-95.
- 165 - Bassik, M.C., Scorrano, L., Oakes, S.A., Pozzan, T. & Korsmeyer, S.J. Phosphorylation of BCL-2 regulates ER Ca²⁺ homeostasis and apoptosis. *Embo J* 2004;23:1207-16.

- 166 - Lei, K. & Davis, R.J. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:2432-7.
- 167 - Micheau, O. & Tschopp, J. Induction of TNF receptor I-mediated apoptosis via two sequential signaling complexes. *Cell* 2003;114:181-90.
- 168 - Wang, X., Zhang, J., Kim, H.P., Wang, Y., Choi, A.M. & Ryter, S.W. Bcl-XL disrupts death-inducing signal complex formation in plasma membrane induced by hypoxia/reoxygenation. *Faseb J* 2004;18:1826-33.
- 169 - Oleinick, N., Morris, R.L. & Belichenko, I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci* 2002;1:1-21.
- 170 - Almeida, R.D., Manadas, B.J., Carvalho, A.P. & Duarte, C.B. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 2004;1704:59-86.
- 171 - Buytaert, E., Dewaele, M. & Agostinis, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 2007;1776:86-107.
- 172 - Hilf, R. Mitochondria are targets of photodynamic therapy. *J Bioenerg Biomembr* 2007;39:85-9.
- 173 - Furre, I.E., Moller, M.T., Shahzidi, S., Nesland, J.M. & Peng, Q. Involvement of both caspase-dependent and -independent pathways in apoptotic induction by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy in human lymphoma cells. *Apoptosis* 2006;11:2031-42.
- 174 - Kriska, T., Korytowski, W. & Girotti, A.W. Role of mitochondrial cardiolipin peroxidation in apoptotic photokilling of 5-aminolevulinate-treated tumor cells. *Arch Biochem Biophys* 2005;433:435-46.
- 175 - Furre, I.E., Shahzidi, S., Luksiene, Z., Moller, M.T., Borgen, E., Morgan, J., Tkacz-Stachowska, K., Nesland, J.M. & Peng, Q. Targeting PBR by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy induces apoptosis through translocation of apoptosis-inducing factor in human leukemia cells. *Cancer Res* 2005;65:11051-60.
- 176 - Zawacka-Pankau, J., Issaeva, N., Hossain, S., Pramanik, A., Selivanova, G. & Podhajski, A.J. Protoporphyrin IX interacts with wild-type p53 protein in vitro and induces cell death of human colon cancer cells in a p53-dependent and -independent manner. *J Biol Chem* 2007;282:2466-72.
- 177 - Grebenova, D., Kuzelova, K., Smetana, K., Pluskalova, M., Cajthamlova, H., Marinov, I., Fuchs, O., Soucek, J., Jarolim, P. & Hrkal, Z. Mitochondria and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-

- aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. *J Photochem Photobiol B* 2003;69:71-85.
- 178 - Osaki, T., Takagi, S., Hoshino, Y., Okumura, M. & Fujinaga, T. Intracellular localization and concentration as well as photodynamic effects of benzoporphyrin derivative monoacid ring A in four types of rodent tumor cells. *Cancer Lett* 2006;243:281-92.
- 179 - Belzacq, A.S., Jacotot, E., Vieira, H.L., Mistro, D., Granville, D.J., Xie, Z., Reed, J.C., Kroemer, G. & Brenner, C. Apoptosis induction by the photosensitizer verteporfin: identification of mitochondrial adenine nucleotide translocator as a critical target. *Cancer Res* 2001;61:1260-4.
- 180 - Granville, D.J., Shaw, J.R., Leong, S., Carthy, C.M., Margaron, P., Hunt, D.W. & McManus, B.M. Release of cytochrome c, Bax migration, Bid cleavage, and activation of caspases 2, 3, 6, 7, 8, and 9 during endothelial cell apoptosis. *Am J Pathol* 1999;155:1021-5.
- 181 - Granville, D.J., Carthy, C.M., Jiang, H., Shore, G.C., McManus, B.M. & Hunt, D.W. Rapid cytochrome c release, activation of caspases 3, 6, 7 and 8 followed by Bap31 cleavage in HeLa cells treated with photodynamic therapy. *FEBS Lett* 1998;437:5-10.
- 182 - Granville, D.J., Cassidy, B.A., Ruehlmann, D.O., Choy, J.C., Brenner, C., Kroemer, G., van Breemen, C., Margaron, P., Hunt, D.W. & McManus, B.M. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor and cytochrome c during smooth muscle cell apoptosis. *Am J Pathol* 2001;159:305-11.
- 183 - Granville, D.J., Ruehlmann, D.O., Choy, J.C., Cassidy, B.A., Hunt, D.W., van Breemen, C. & McManus, B.M. Bcl-2 increases emptying of endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores during photodynamic therapy-induced apoptosis. *Cell Calcium* 2001;30:343-50.
- 184 - Usuda, J., Chiu, S., Azizuddin, K., Xue, L., Lam, M., Nieminen, A.L. & Oleinick, N. Promotion of photodynamic therapy-induced apoptosis by the mitochondrial protein smac/DIABLO: dependence on Bax. *Photochem Photobiol* 2002;76:217-223.
- 185 - Kim, H.R., Luo, Y., Li, G. & Kessel, D. Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after bcl-2 transfection. *Cancer Res* 1999;59:3429-32.
- 186 - Kessel, D. & Castelli, M. Evidence that bcl-2 is the target of three photosensitizers that induce a rapid apoptotic response. *Photochem Photobiol* 2001;74:318-22.
- 187 - Reiners, J.J., Caruso, J.A., Mathieu, P., Chelladurai, B., Yin, X.M. & Kessel, D. Release of cytochrome c and activation of pro-caspase-9 following lysosomal photodamage involves Bid cleavage. *Cell Death Differ* 2002;9:934-944.
- 188 - Matroule, J.Y., Carthy, C.M., Granville, D.J., Jolles, O., Hunt, D.W.C. & Piette, J. Mechanism of colon cancer cell apoptosis mediated by pyropheophorbide-a methylester photosensitization. *Oncogene* 2001;20:4070-4084.

- 189 - Agostinis, P., Buytaert, E., Breysens, H. & Hendrickx, N. Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. *Photochem Photobiol Sci* 2004;
- 190 - Schempp, C.M., Simon-Haarhaus, B., Termeer, C.C. & Simon, J.C. Hypericin photo-induced apoptosis involves the tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and activation of caspase-8. *FEBS Lett* 2001;493:26-30.
- 191 - Ali, S.M., Chee, S.K., Yuen, G.Y. & Olivo, M. Hypericin induced death receptor-mediated apoptosis in photoactivated tumor cells. *Int J Mol Med* 2002;9:601-16.
- 192 - Kessel, D., Castelli, M. & Reiners, J.J. Ruthenium red-mediated suppression of Bcl-2 loss and Ca(2+) release initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum: scavenging of reactive oxygen species. *Cell Death Differ* 2005;12:502-11.
- 193 - Lam, M., Oleinick, N.L. & Nieminen, A.L. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. *J Biol Chem* 2001;276:47379-47386.
- 194 - Vantieghem, A., Xu, Y., Declercq, W., Vandenabeele, P., Denecker, G., Vandenheede, J.R., Merlevede, W., de Witte, P.A. & Agostinis, P. Different pathways mediate cytochrome c release after photodynamic therapy with hypericin. *Photochem Photobiol* 2001;74:133-142.
- 195 - Chaloupka, R., Petit, P.X., Israel, N. & Sureau, F. Over-expression of Bcl-2 does not protect cells from hypericin photo-induced mitochondrial membrane depolarization, but delays subsequent events in the apoptotic pathway. *FEBS Lett* 1999;462:295-301.
- 196 - Buytaert, E., Callewaert, G., Hendrickx, N., Scorrano, L., Hartmann, D., Missiaen, L., Vandenheede, J.R., Heirman, I., Grooten, J. & Agostinis, P. Role of endoplasmic reticulum depletion and multidomain proapoptotic BAX and BAK proteins in shaping cell death after hypericin-mediated photodynamic therapy. *Faseb J* 2006;20:756-8.
- 197 - Chiu, S.-M., Xue, L.-Y., Usuda, J., Azizuddin, K. & Oleinick, N.L. Bax is essential for mitochondrion-mediated apoptosis but not for cell death caused by photodynamic therapy. *Br J Cancer* 2003;89:1590-1597.
- 198 - Chiu, S.M., Xue, L.Y., Azizuddin, K. & Oleinick, N.L. Photodynamic therapy-induced death of HCT 116 cells: Apoptosis with or without Bax expression. *Apoptosis* 2005;10:1357-68.
- 199 - Usuda, J., Azizuddin, K., Chiu, S.M. & Oleinick, N.L. Association between the photodynamic loss of Bcl-2 and the sensitivity to apoptosis caused by phthalocyanine photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 2003;78:1-8.
- 200 - Xue, L.Y., Chiu, S.M., Fiebig, A., Andrews, D.W. & Oleinick, N.L. Photodamage to multiple Bcl-xL isoforms by photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Oncogene* 2003;22:9197-204.

- 201 - Usuda, J., Chiu, S.M., Murphy, E.S., Lam, M., Nieminen, A.L. & Oleinick, N.L. Domain-dependent photodamage to Bcl-2. A membrane anchorage region is needed to form the target of phthalocyanine photosensitization. *J Biol Chem* 2003;278:2021-9.
- 202 - Srivastava, M., Ahmad, N., Gupta, S. & Mukhtar, H. Involvement of Bcl-2 and Bax in photodynamic therapy-mediated apoptosis. Antisense Bcl-2 oligonucleotide sensitizes RIF 1 cells to photodynamic therapy apoptosis. *J Biol Chem* 2001;276:15481-8.
- 203 - Chiu, S.M. & Oleinick, N.L. Dissociation of mitochondrial depolarization from cytochrome c release during apoptosis induced by photodynamic therapy. *Br J Cancer* 2001;84:1099-106.
- 204 - Carthy, C.M., Granville, D.J., Jiang, H., Levy, J.G., Rudin, C.M., Thompson, C.B., McManus, B.M. & Hunt, D.W. Early release of mitochondrial cytochrome c and expression of mitochondrial epitope 7A6 with prophylin-derived photosensitizer: Bcl-2 and Bcl-xL overexpression do not prevent early mitochondrial events but still depress caspase activity. *Lab Invest* 1999;79:953-965.
- 205 - Tamietti, B.F., Machado, A.H., Maftoum-Costa, M., Da Silva, N.S., Tedesco, A.C. & Pacheco-Soares, C. Analysis of mitochondrial activity related to cell death after PDT with AlPCS(4). *Photomed Laser Surg* 2007;25:175-9.
- 206 - Wispriyono, B., Schmelz, E., Pelayo, H., Hanada, K. & Separovic, D. A role for the de novo sphingolipids in apoptosis of photosensitized cells. *Exp Cell Res* 2002;279:153-65.
- 207 - Dolgachev, V., Farooqui, M.S., Kulaeva, O.I., Tainsky, M.A., Nagy, B., Hanada, K. & Separovic, D. De novo ceramide accumulation due to inhibition of its conversion to complex sphingolipids in apoptotic photosensitized cells. *J Biol Chem* 2004;279:23238-49.
- 208 - Xue, L.Y., Chiu, S.M. & Oleinick, N.L. Photodynamic therapy-induced death of MCF-7 human breast cancer cells: a role for caspase-3 in the late steps of apoptosis but not for the critical lethal event. *Exp Cell Res* 2001;263:145-55.
- 209 - Ricchelli, F., Barbato, P., Milani, M., Gobbo, S., Salet, C. & Moreno, G. Photodynamic action of porphyrin on Ca²⁺ influx in endoplasmic reticulum: a comparison with mitochondria. *Biochem J* 1999;338:221-227.
- 210 - Vantieghem, A., Xu, Y., Assefa, Z., Piette, J., Vandenheede, J.R., Merlevede, W., de Witte, P.A. & Agostinis, P. Phosphorylation of Bcl-2 in G2/M phase-arrested cells following photodynamic therapy with hypericin involves a CDK1-mediated signal and delays the onset of apoptosis. *J Biol Chem* 2002;277:37718-37731.
- 211 - Wang, H.P., Hanlon, J.G., Rainbow, A.J., Espiritu, M. & Singh, G. Up-regulation of Hsp27 plays a role in the resistance of human colon carcinoma HT29 cells to photooxidative stress. *Photochem Photobiol* 2002;76:98-104.

- 212 - Hanlon, J.G., Adams, K., Rainbow, A.J., Gupta, R.S. & Singh, G. Induction of Hsp60 by Photofrin-mediated photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2001;64:55-61.
- 213 - Nonaka, M., Ikeda, H. & Inokuchi, T. Inhibitory effect of heat shock protein 70 on apoptosis induced by photodynamic therapy in vitro. *Photochem Photobiol* 2004;79:94-8.
- 214 - Mitra, S., Goren, E.M., Frelinger, J.G. & Foster, T.H. Activation of heat shock protein 70 promoter with meso-tetrahydroxyphenyl chlorin photodynamic therapy reported by green fluorescent protein in vitro and in vivo. *Photochem Photobiol* 2003;78:615-22.
- 215 - Gomer, C.J., Ryter, S.W., Ferrario, A., Rucker, N., Wong, S. & Fisher, A.M. Photodynamic therapy-mediated oxidative stress can induce expression of heat shock proteins. *Cancer Res* 1996;56:2355-60.
- 216 - Mak, N.K., Li, K.M., Leung, W.N., Wong, R.N., Huang, D.P., Lung, M.L., Lau, Y.K. & Chang, C.K. Involvement of both endoplasmic reticulum and mitochondria in photokilling of nasopharyngeal carcinoma cells by the photosensitizer Zn-BC-AM. *Biochem Pharmacol* 2004;68:2387-96.
- 217 - Wong, S., Luna, M., Ferrario, A. & Gomer, C.J. CHOP activation by photodynamic therapy increases treatment induced photosensitization. *Lasers Surg Med* 2004;35:336-41.
- 218 - Grebenova, D., Halada, P., Stulik, J., Havlicek, V. & Hrkal, Z. Protein changes in HL60 leukemia cells associated with 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Early effects on endoplasmic reticulum chaperones. *Photochem Photobiol* 2000;72:16-22.
- 219 - Magi, B., Ettorre, A., Liberatori, S., Bini, L., Andreassi, M., Frosali, S., Neri, P., Pallini, V. & Di Stefano, A. Selectivity of protein carbonylation in the apoptotic response to oxidative stress associated with photodynamic therapy: a cell biochemical and proteomic investigation. *Cell Death Differ* 2004;11:842-52.
- 220 - Granville, D.J., Jiang, H., McManus, B.M. & Hunt, D.W. Fas ligand and TRAIL augment the effect of photodynamic therapy on the induction of apoptosis in JURKAT cells. *Int Immunopharmacol* 2001;1:1831-40.
- 221 - Assefa, Z., Vantieghem, A., Declercq, W., Vandenabeele, P., Vandenheede, J.R., Merlevede, W., de Witte, P. & Agostinis, P. The activation of the c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways protects HeLa cells from apoptosis following photodynamic therapy with hypericin. *J Biol Chem* 1999;274:8788-96.
- 222 - Takahashi, H., Itoh, Y., Miyauchi, Y., Nakajima, S., Sakata, I., Ishida-Yamamoto, A. & Iizuka, H. Activation of two caspase cascades, caspase 8/3/6 and caspase 9/3/6, during photodynamic therapy using a novel photosensitizer, ATX-S10(Na), in normal human keratinocytes. *Arch Dermatol Res* 2003;295:242-8.

- 223 - Zhuang, S., Lynch, M.C. & Kochevar, I.E. Caspase-8 mediates caspase-3 activation and cytochrome c release during singlet oxygen-induced apoptosis of HL-60 cells. *Exp Cell Res* 1999;250:203-12.
- 224 - Kessel, D. Protection of Bcl-2 by salubrinal. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;346:1320-3.
- 225 - Xue, L.Y., Chiu, S.M., Azizuddin, K., Joseph, S. & Oleinick, N.L. The death of human cancer cells following photodynamic therapy: apoptosis competence is necessary for Bcl-2 protection but not for induction of autophagy. *Photochem Photobiol* 2007;83:1016-23.
- 226 - Kessel, D., Vicente, M.G. & Reiners, J.J., Jr. Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy. *Lasers Surg Med* 2006;38:482-8.
- 227 - Assuncao Guimaraes, C. & Linden, R. Programmed cell deaths. Apoptosis and alternative deathstyles. *Eur J Biochem* 2004;271:1638-50.
- 228 - Proskuryakov, S.Y., Konoplyannikov, A.G. & Gabai, V.L. Necrosis: a specific form of programmed cell death? *Exp Cell Res* 2003;283:1-16.
- 229 - Piette, J., Volanti, C., Vantieghem, A., Matroule, J.Y., Habraken, Y. & Agostinis, P. Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers. *Biochemical Pharmacology* 2003;66:1651-1659.
- 230 - Dellinger, M. Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochem Photobiol* 1996;64:182-187.
- 231 - Jiang, F., Zhang, X., Kalkanis, S.N., Zhang, Z., Yang, H., Katakowski, M., Hong, X., Zheng, X., Zhu, Z. & Chopp, M. Combination therapy with antiangiogenic treatment and photodynamic therapy for the nude mouse bearing u87 glioblastoma. *Photochem Photobiol* 2008;84:128-37.
- 232 - Yokota, T., Ikeda, H., Inokuchi, T., Sano, K. & Koji, T. Enhanced cell death in NR-S1 tumor by photodynamic therapy: possible involvement of Fas and Fas ligand system. *Lasers Surg Med* 2000;26:449-60.
- 233 - Engbrecht, B.W., Menon, C., Kachur, A.V., Hahn, S.M. & Fraker, D.L. Photofrin-mediated photodynamic therapy induces vascular occlusion and apoptosis in a human sarcoma xenograft model. *Cancer Res* 1999;59:4334-42.
- 234 - Yamamoto, J., Yamamoto, S., Hirano, T., Li, S., Koide, M., Kohno, E., Okada, M., Inenaga, C., Tokuyama, T., Yokota, N., Terakawa, S. & Namba, H. Monitoring of singlet oxygen is useful for predicting the photodynamic effects in the treatment for experimental glioma. *Clin Cancer Res* 2006;12:7132-9.
- 235 - Webber, J., Luo, Y., Crilly, R., Fromm, D. & Kessel, D. An apoptotic response to photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin in vivo. *J Photochem Photobiol B* 1996;35:209-11.

- 236 - Walt, H., Nap, M., Dorward, A.M., Leers, M.P.G., Tennent, B.J., Varga, Z., Stallmach, T., Björklund, V. & Beamer, W.G. Early apoptotic responses in transgenic mouse mammary carcinoma for photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2006;3:227-233.
- 237 - Matsubara, A., Nakazawa, T., Noda, K., She, H., Connolly, E., Young, T.A., Ogura, Y., Gragoudas, E.S. & Miller, J.W. Photodynamic therapy induces caspase-dependent apoptosis in rat CNV model. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007;48:4741-7.
- 238 - Kaneko, T., Chiba, H., Yasuda, T. & Kusama, K. Detection of photodynamic therapy-induced early apoptosis in human salivary gland tumor cells in vitro and in a mouse tumor model. *Oral Oncol* 2004;40:787-92.
- 239 - Chen, B., Roskams, T., Xu, Y., Agostinis, P. & de Witte, P.A. Photodynamic therapy with hypericin induces vascular damage and apoptosis in the RIF-1 mouse tumor model. *Int J Cancer* 2002;98:284-90.
- 240 - Zaidi, S.I., Oleinick, N.L., Zaim, M.T. & Mukhtar, H. Apoptosis during photodynamic therapy-induced ablation of RIF-1 tumors in C3H mice: electron microscopic, histopathologic and biochemical evidence. *Photochem Photobiol* 1993;58:771-6.
- 241 - Kalka, K., Ahmad, N., Criswell, T., Boothman, D. & Mukhtar, H. Up-regulation of clusterin during phthalocyanine 4 photodynamic therapy-mediated apoptosis of tumor cells and ablation of mouse skin tumors. *Cancer Res* 2000;60:5984-7.
- 242 - Agarwal, R., Korman, N.J., Mohan, R.R., Feyes, D.K., Jawed, S., Zaim, M.T. & Mukhtar, H. Apoptosis is an early event during phthalocyanine photodynamic therapy-induced ablation of chemically induced squamous papillomas in mouse skin. *Photochem Photobiol* 1996;63:547-52.
- 243 - Colussi, V.C., Feyes, D.K., Mulvihill, J.W., Li, Y.S., Kenney, M.E., Elmets, C.A., Oleinick, N.L. & Mukhtar, H. Phthalocyanine 4 (Pc 4) photodynamic therapy of human OVCAR-3 tumor xenografts. *Photochem Photobiol* 1999;69:236-41.
- 244 - Whitacre, C.M., Feyes, D.K., Satoh, T., Grossmann, J., Mulvihill, J.W., Mukhtar, H. & Oleinick, N.L. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4 of SW480 human colon cancer xenografts in athymic mice. *Clin Cancer Res* 2000;6:2021-7.
- 245 - Whitacre, C.M., Satoh, T.H., Xue, L., Gordon, N.H. & Oleinick, N.L. Photodynamic therapy of human breast cancer xenografts lacking caspase-3. *Cancer Lett* 2002;179:43-9.
- 246 - Hakumaki, J.M. & Liimatainen, T. Molecular imaging of apoptosis in cancer. *Eur J Radiol* 2005;56:143-53.
- 247 - Stadelmann, C. & Lassmann, H. Detection of apoptosis in tissue sections. *Cell Tissue Res* 2000;301:19-31.

- 248 - Mirakian, R., Nye, K., Palazzo, F.F., Goode, A.W. & Hammond, L.J. Methods for detecting apoptosis in thyroid diseases. *J Immunol Methods* 2002;265:161-75.
- 249 - Allen, R.T., Hunter, W.J., 3rd & Agrawal, D.K. Morphological and biochemical characterization and analysis of apoptosis. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1997;37:215-28.
- 250 - Barrett, K.L., Willingham, J.M., Garvin, A.J. & Willingham, M.C. Advances in cytochemical methods for detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 2001;49:821-32.
- 251 - Lesauskaite, V., Epistolato, M.C., Ivanoviene, L. & Tanganelli, P. Apoptosis of cardiomyocytes in explanted and transplanted hearts. Comparison of results from in situ TUNEL, ISEL, and ISOL reactions. *Am J Clin Pathol* 2004;121:108-16.
- 252 - Gown, A.M. & Willingham, M.C. Improved detection of apoptotic cells in archival paraffin sections: immunohistochemistry using antibodies to cleaved caspase 3. *J Histochem Cytochem* 2002;50:449-54.
- 253 - Puig, B., Tortosa, A. & Ferrer, I. Cleaved caspase-3, caspase-7 and poly (ADP-ribose) polymerase are complementarily but differentially expressed in human medulloblastomas. *Neurosci Lett* 2001;306:85-8.
- 254 - Holubec, H., Payne, C.M., Bernstein, H., Dvorakova, K., Bernstein, C., Waltmire, C.N., Warneke, J.A. & Garewal, H. Assessment of apoptosis by immunohistochemical markers compared to cellular morphology in ex vivo-stressed colonic mucosa. *J Histochem Cytochem* 2005;53:229-35.
- 255 - Duan, W.R., Garner, D.S., Williams, S.D., Funckes-Shippy, C.L., Spath, I.S. & Blomme, E.A. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol* 2003;199:221-8.
- 256 - Castano, A.P., Mroz, P. & Hamblin, M.R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat Rev Cancer* 2006;6:535-45.
- 257 - Chiu, S., Evans, H.H., Lam, M., Nieminen, A. & Oleinick, N.L. Phthalocyanine 4 photodynamic therapy-induced apoptosis of mouse L5178Y-R cells results from a delayed but extensive release of cytochrome c from mitochondria. *Cancer Lett* 2001;165:51-8.
- 258 - Marchal, S., Bezdetnaya, L. & Guillemin, F. Modality of cell death induced by Foscan[®]-based photodynamic treatment in human colon adenocarcinoma cell line HT29. *Biochemistry (Mosc)* 2004;69:45-49.

ANNEXE

LISTE DES ABBREVIATIONS

$^1\text{O}_2$	oxygène singulet
AB	acide bongkreique
ADN	acide desoxyribonucléique
AIF	apoptosis inducing factor
ALA	acide 5-aminolevulinique
AlPc	chlorine aluminium phthalocyanine
ANT	adenine nucleotide transporter
Apaf-1	apoptosis protease-activating factor-1
ARN	acide ribonucléique
ATP	adénosine tri-phosphate
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
BH	bcl-2 homology
BPD-MA	benzoporphyrin derivative monoacid ring
CARD	caspase activation and recruitment domain
CHOP	C/EBP homologous protein
CL	cardiolipine
CPO	9-capronyloxy-tetrakis (methoxyethyl) porphycene
CsA	cyclosporine A
CypD	cyclophiline D
Cyt c	cytochrome c
$\Delta\Psi_m$	dépolarisation membranaire mitochondriale
ERO	espèces réactives de l'oxygène
GRP	glucose-Related Protein
h ν	lumière
HpD	hématoporphyrine dérivée
HSP	heat shock protein
IAP	Inhibitor Apoptosis Protein
IDL	intervalle drogue-lumière
IL	interleukine
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal Kinase
MAC	mitochondrial apoptosis-induced channel
MOMP	perméabilisation de la membrane mitochondriale
m-THPC	meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorine
Npe6	mono-L-aspartyl chlorin e6
PARP	poly(ADP-ribose) Polymerase-1

PBR	récepteurs périphériques des benzodiazépines
Pc	phthalocyanine
Pc 4	phthalocyanine siliconée
PDI	protein Disulfide Isomerase
PDT	thérapie photodynamique
pO ₂	pression partielle en oxygène
PpIX	protoporphyrine IX
PPME	pyropheophorbide-a methylester
PS	photosensibilisateur
PTP	pore de perméabilité temporaire
RE	réticulum endoplasmique
RIF-1	radiation induced fibrosarcoma
SERCA	sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Ca ²⁺ ATPase
SnET ₂	ethyl etiopurpurin I
TNF	tumor necrosis factor
TPZ	trifluoroperazine
UPR	unfolded Protein Response
UV	ultra-violet
VDAC	voltage dependent anion channel
ZnPc	zinc (II) phthalocyanine

RESUME

Le but de cette thèse est de développer une stratégie pro-apoptotique à partir des paramètres pouvant moduler l'apoptose photoinduite par le Foscan® dans des modèles précliniques d'adénocarcinome humain.

La PDT avec le Foscan® a été appliquée *in vitro* sur lignées cellulaires où une apoptose modérée a été obtenue *via* l'implication indirecte de la voie mitochondriale.

La modulation de l'apoptose photoinduite par l'oxygénation a été démontrée sur sphéroïde, modèle de micro-tumeur non vascularisée. Une irradiance faible, garantissant le maintien de l'oxygénation du sphéroïde, favorise l'activation de la caspase-3 photoinduite par le Foscan®. Le deuxième paramètre favorisant l'apoptose photoinduite est l'accroissement du temps d'incubation du photosensibilisateur avec les cellules MCF-7, ce qui modifie sa localisation subcellulaire. Après 3h d'incubation, le Foscan® est essentiellement localisé dans le réticulum endoplasmique (RE) et l'appareil de Golgi. Après irradiation, le stress oxydant du RE évalué par l'induction de la protéine chaperone GRP78 suivie de la réponse apoptotique mitochondriale et de l'activation des caspases a été observée. Après 24h d'incubation avec le Foscan®, la localisation dans le RE est renforcée ainsi que l'expression photoinduite de GRP78 corrélée avec une augmentation de l'activation de la caspase-7 indépendamment de la réponse mitochondriale. Après PDT *in vivo*, l'estimation par immunohistochimie sur coupe tissulaire de l'activation de la caspase-7 et de la caspase-3 montre une activation prédominante de la caspase-3 ce qui suggère une apoptose majoritairement dépendante de la caspase-3 dans les tumeurs d'adénocarcinome colique HT29 traitées par Foscan®-PDT.

MOTS CLES: Thérapie photodynamique, Foscan® (m-THPC), apoptose, caspases

Proapoptotic strategy in Foscan®-mediated photodynamic therapy applied on preclinical models from human adenocarcinoma

In order to develop a proapoptotic strategy in Foscan®-mediated photodynamic therapy (PDT) an evaluation of the parameters that govern the modulation of photoinduced apoptosis was performed on preclinical model from human adenocarcinoma.

Moderate apoptosis was measured in Foscan® photosensitised tumour cells *in vitro*. The mitochondrial pathway was assumed to be indirectly induced by Foscan®-PDT.

Spheroids were used to investigate the influence of oxygen consumption, through the modulation of fluence rate, on the induction of apoptosis. By using a low fluence rate, an oxygen conservative regimen, we demonstrated an increase in the activation of caspase-3 induced by Foscan®-PDT. The modulation of photoinduced apoptosis by extending the incubation time of Foscan® with MCF-7 cells was further investigated. After 3h incubation, the photosensitizer was mainly localised in the endoplasmic reticulum (ER) and Golgi apparatus. Following irradiation, ER oxidative stress through the induction of the chaperon protein GRP78 was observed. Subsequent apoptotic mitochondria response and caspase activation were induced. After 24h incubation with Foscan®, the ER localisation of the photosensitizer was intensified. As results, an increase in GRP78 expression correlated with an increase in caspase-7 activation independently of the mitochondria response was obtained. After *in vivo* PDT, immunohistochemistry was applied on tissue sections to evaluate the activation of caspases -3 and -7. Caspase-3 activation was found predominant suggesting a caspase-3 mediated apoptotic pathway in HT29 tumours subjected to Foscan®-PDT.

KEY WORDS : Photodynamic therapy, Foscan® (m-THPC), apoptosis, caspases