

Université de Sherbrooke

**L'ajout de bromes en position *N*-allyl de porphyrines cationiques
améliore leurs propriétés radio- et photosensibilisantes**

par

Nathalie Picard, B.Sc.

Département de Médecine nucléaire et de radiobiologie

**Mémoire présenté à la
Faculté de médecine et des sciences de la santé
En vue de l'obtention du grade de
Maître ès Science (M.Sc.)**

Membres du jury :

**Benoit Paquette Ph.D. – Médecine nucléaire et radiobiologie
Johan E. van Lier Ph.D. - Médecine nucléaire et radiobiologie
Darel Hunting Ph.D. - Médecine nucléaire et radiobiologie
Gilles Dupuis Ph.D. - Biochimie**

30 janvier 2009

*Pagination erronée.
Laisser tel quel par
l'étudiante.*



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-61422-8
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-61422-8

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

« La vie, c'est comme une bicyclette. Pour garder son équilibre, il faut avancer. »
Albert Einstein

« Si tu ne sais pas où tu t'en vas, tu risques de mettre longtemps pour y arriver. »
Proverbe Touareg

Ce mémoire est dédié à tous ceux et celles qui croient en l'enrichissement des compétences en recherche et à ces gens expérimentés/conférenciers qui transmettent de bon cœur leur savoir et surtout leur savoir-faire et leur savoir-être à la relève. Merci!

Table des matières

LISTES DES ILLUSTRATIONS	3
LISTE DES SIGLES, ABRÉVIATIONS ET SYMBOLES.....	4
RÉSUMÉ	5
INTRODUCTION.....	6
1. LE CANCER.....	6
1.1. Généralités	6
1.2. Cancer du sein.....	7
1.3. Les types de morts cellulaires	8
2. SURVOL DE L'ARSENAL DISPONIBLE CONTRE LE CANCER	18
2.1. Chirurgie de résection.....	18
2.2. Chimiothérapie.....	19
2.3. Radiothérapie.....	21
2.4. Radiosensibilisateurs et radiosensibilisants.....	28
2.5. Thérapie photodynamique.....	34
2.6. Spécificité des porphyrines envers les cellules cancéreuses et leur localisation intracellulaire	45
3. OBJECTIFS	47
ARTICLE SCIENTIFIQUE	48
4. ARTICLE SCIENTIFIQUE.....	48
4.1. Avant-propos : contribution de l'auteure à l'article scientifique.....	48
4.2. Article soumis : Bromines on N-allyl position of cationic porphyrins affect both radio/photosensitizing properties.....	50
5. RÉSULTATS NON PUBLIÉS ET LIMITATIONS AU PROJET	61
5.1. Synthèses chimiques	61
5.2. Spectrométrie de masse.....	62
5.3. Quantification des porphyrines accumulées dans les cellules.....	65
DISCUSSION	67
6. MODIFICATIONS CHIMIQUES DES SENSIBILISATEURS ET LEUR IMPACT SUR LA SENSIBILISATION DES CELLULES CANCÉREUSES	67
6.1. Comment les atomes de brome augmentent l'effet photosensibilisateur.....	67
6.2. Contribution du métal central à l'effet photosensibilisateur.....	69
6.3. Comment les atomes de brome augmentent l'effet radiosensibilisateur	72
6.4. Contribution du métal central à l'effet radiosensibilisateur	77
7. COMPARAISON ENTRE LES MÉTHODES DE BROMINATION.....	77
8. LOCALISATION INTRACELLULAIRE	82
9. INTERACTIONS MOLÉCULAIRES À EXPLORER	84
CONCLUSIONS	86
REMERCIEMENTS	87
LISTE DES RÉFÉRENCES	88

Listes des illustrations

Liste des illustrations

Figure 1 : Apoptose.....	7
Figure 2 : Apoptose et oncose : changements morphologiques	9
Figure 3 : Mort différée.....	12
Figure 4 : Effet direct et indirect de la radiation ionisante sur l'ADN	18
Figure 5 : Mécanisme de la génération d'espèces réactives en thérapie photodynamique	35
Figure 6 : Fragmentation en spectrométrie de masse.....	60
Figure 7 : Substitutions électrophiles sur des hétérocycles azotés et leurs effets sur leurs propriétés radiosensibilisatrices.....	68
Figure 8 : Effet Auger	72
Figure 9 : Résultats de la microscopie confocale à fluorescence.....	78-79

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principaux agents non dérivés de porphyrines étudiés jusqu'à présent comme radiosensibilisateurs potentiels.....	25-27
Tableau 2 : Principaux photosensibilisateurs non dérivés de porphyrines	37

Liste des sigles, abréviations et symboles

Abcb6.....	protéine <i>ATP-binding cassette, sub-family B, member 6</i>
ADN.....	acide désoxyribonucléique
AIF.....	<i>apoptosis inducing factor</i>
ARN.....	acide ribonucléique
ARNm.....	acide ribonucléique messenger
ATP.....	adénosine triphosphate
Bax.....	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2.....	<i>B-cell lymphoma 2</i>
Bcl-xL.....	<i>basal cell lymphoma extra-large</i>
Bid.....	<i>BH3 interacting domain death agonist</i>
BrdUrd.....	5-bromodésoxyuridine
BrdU.....	5-bromodésoxyuridine
CAD.....	<i>caspase activated DNase</i>
COX.....	cyclooxygénase
Da.....	daltons (unité de mesure de poids moléculaire)
DMF.....	<i>N,N</i> -diméthylformamide
E2F.....	famille E2F des facteurs de transcription
EGFR.....	récepteurs pour <i>epithelial growth factor</i> (portent plusieurs noms)
ESI.....	<i>electrospray ionization</i> (électronébullisation)
Gy.....	gray (unité de mesure des radiations ionisantes)
HCP1.....	<i>heme carrier protein 1</i>
HPLC.....	chromatographie liquide sous haute pression
HtrA2/Omi.....	<i>high temperature requirement protein A2</i>
JNK.....	<i>c-Jun N-terminal kinase</i>
M.....	ion moléculaire en spectrométrie de masse
MALDI-TOF.....	<i>matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight</i>
MMP.....	métalloprotéinases de matrice
MTT.....	3-(4,5-diméthylthiazole-2-yl)-2,5-diphényltétrazoliumbromide
p16.....	<i>cyclin-dependant kinase inhibitor 2A</i>
p21.....	<i>cyclin-dependant kinase inhibitor 1A</i>
p53.....	protéine 53 (facteur de transcription, suppresseur de tumeur)
PAK2.....	<i>p21-activated kinase 2</i>
PARP.....	polyADP-ribose polymérase
PBR.....	récepteur périphérique des benzodiazépines
RMN ¹ H.....	résonance magnétique nucléaire du proton
ROS.....	espèces réactives de l'oxygène
pRb.....	protéine du rétinoblastome (suppresseur de tumeur)
SMAC/DIABLO.....	<i>Second mitochondria-derived activator of caspase/</i> <i>direct inhibitor of apoptosis-binding protein with low pI</i>
siARN.....	<i>silencing RNA</i> , un ARN complémentaire à l'ARNm
TEL.....	transfert linéaire d'énergie
XRT.....	radiothérapie aux rayons X
5FU.....	5-fluorouracile

Résumé

Introduction : La radiothérapie et la photothérapie consistent à cibler spécifiquement les cellules cancéreuses. Les cellules et tumeurs cancéreuses absorbent davantage les porphyrines que le tissu normal. Bien que quelques photosensibilisateurs aient été approuvés en clinique, aucun radiosensibilisateur n'a été approuvé jusqu'à présent. D'intenses efforts de recherche se dévouent à améliorer l'efficacité et à minimiser les effets secondaires des photo- et radiosensibilisateurs. Les halogènes et le métal central dans les porphyrines modifient la durée de leur état excité. Plus l'état excité dure longtemps, plus d'espèces réactives sont générées pour médier l'élimination thérapeutique des cellules cancéreuses. Le but de cette étude: comparer par une étude structure-activité les propriétés photo- et radiosensibilisatrices de porphyrines cationiques bromées.

Méthodes : Une série de porphyrines cationiques ont été synthétisées avec des bromes en position β - ou *N*-allyl. La survie métabolique des cellules cancéreuses a été mesurée par un essai MTT après une thérapie photodynamique en utilisant tout le spectre visible. D'autre part, la survie globale des cellules a été mesurée par un essai clonogénique après une irradiation de 0 à 6 Gy avec des rayons gamma provenant de sources de ^{60}Co . La microscopie confocale à fluorescence a montré la localisation cellulaire des porphyrines cationiques.

Résultats : À une concentration de 1 μM , le sensibilisateur le plus efficace à la fois comme photo- et radiosensibilisateur portait huit bromes en position *N*-allyl. La microscopie confocale à fluorescence a révélé un ciblage spécifique des mitochondries et un peu au noyau.

Discussion : L'augmentation des propriétés radio- et photosensibilisantes par l'ajout de bromes en position *N*-allyl sur des porphyrines cationiques pourrait être exploitée pour développer de nouveaux agents radio- et photosensibilisants pour traiter le cancer en combinaison avec la radiothérapie ou en thérapie photodynamique.

Mots-clefs : *Porphyrines, cancer, radiosensibilisateurs, photosensibilisateurs, métalloporphyrines, brome.*

Introduction

1. Le cancer

1.1. Généralités

On estime que 72 700 personnes auront été victimes du cancer au Canada en 2007. Près de 159 000 personnes au Canada auront été bouleversées par un diagnostic de cancer l'an dernier. D'après les taux d'incidence actuels, 39 % des Canadiennes et 44 % des Canadiens seront atteints d'un cancer au cours de leur vie. D'après les taux de mortalité actuels, 24 % des femmes et 28 % des hommes, soit environ 1 Canadien sur 4, mourront du cancer. Considérant que l'augmentation du nombre de nouveaux cas de cancer est principalement attribuable à la croissance démographique et au vieillissement de la population, on prévoit donc une croissance du nombre de cancers dans les prochaines décennies (MARRETT *et al.*, 2007).

En 1971, le président américain Richard Nixon déclarait la guerre au cancer en s'armant du *National Cancer Act*. D'autres pays, dont le Canada, investissent aussi dans la lutte contre le cancer. Les milliards de dollars investis depuis dans la lutte contre le cancer ont permis aux chercheurs de mieux comprendre la maladie et de faire progresser modestement, mais sûrement les méthodes diagnostiques et de traitement. Au Canada, depuis 1994, les taux de mortalité causés par tous les cancers combinés et par la plupart des cancers diminuent chez les deux sexes, sauf pour le cancer du poumon chez les femmes et le cancer du foie chez les hommes. Bien que ces progrès soient encourageants, le cancer demeure la 2^e cause de mortalité au Canada, tous âges confondus (SOCIÉTÉ CANADIENNE DU CANCER, 2008). Selon les taux d'incidence du cancer mentionnés ci haut, près de la moitié des Canadien(ne)s atteints de cancer au cours de leur vie en mourront.

1.2. Cancer du sein

Dans la présente étude, nous avons utilisé comme modèle la lignée cellulaire MDA-MB-231, soit une lignée humaine de carcinome mammaire. En effet, partout dans le monde et au Canada, le cancer du sein s'avère le cancer le plus fréquent chez les femmes adultes de tous âges, occupant à lui seul 22 % des diagnostics de cancer chez les femmes. On estime que 22 000 Canadiennes reçoivent un diagnostic de cancer du sein chaque année. Une femme sur 9 au Canada sera atteinte d'un cancer du sein au cours de sa vie. Le cancer du sein constitue la cause la plus répandue de décès par cancer chez les femmes de moins de 50 ans. Ce cancer tue environ 5 300 femmes par année au Canada, soit l'équivalent d'une femme sur 27. La survie s'améliore graduellement depuis les années 1970, et de manière significative depuis 1989, surtout dans les groupes d'âge où l'on recommande le dépistage (50 à 59 ans et 60 à 69 ans). Bien que ces progrès soient encourageants, on rapporte encore beaucoup de cas de récurrence tumorale, appelée « recurrence » en anglais (SOCIÉTÉ CANADIENNE DU CANCER, 2008).

Dans les cas de récurrence du cancer du sein, les pathologistes classifient souvent les patientes selon les critères suivants :

ER+ : dont la tumeur exprimait les récepteurs aux oestrogènes;

ER- : dont les récepteurs aux oestrogènes étaient indétectables dans la tumeur;

Node + : dont la biopsie des noyaux lymphatiques indiquait de l'invasion par les cellules cancéreuses;

Node - : dont la biopsie des noyaux lymphatiques ne démontrait aucun signe d'invasion.

Sans thérapie adjuvante et après le retrait d'une tumeur cancéreuse du sein ER+, au bout de 5 ans, environ 20-25 % de récurrence a été observée chez les femmes Node -; près de 50 % chez les Node +. Au bout de 10 ans, on note 30-35 % de récurrence dans les cas de Node - et 60 % de récurrence dans les cas de

Node + (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP, 1998). Les survivantes du cancer du sein renseignées sur ces statistiques craignent évidemment la récurrence de leur cancer. Un traitement capable de diminuer significativement les taux de récurrence pourrait améliorer leur qualité de vie et la durée moyenne de leur survie après le traitement du cancer. Des traitements adjuvants basés sur des radio/photosensibilisateurs pourraient diminuer efficacement ces taux de récurrence.

1.3. Les types de morts cellulaires

Plusieurs types de morts cellulaires peuvent être induits par les radiations et les agents cytotoxiques en fonction de leur dose, du type de cellules et des dommages engendrés chez celles-ci. Des définitions des différents types de morts cellulaires abordées sont fournies ci-dessous. Les principaux types de morts cellulaires radioinduites sont les suivants: la mort immédiate, la mort mitotique, la mort différée, la sénescence, l'autophagie et l'apoptose (HENNEQUIN *et al.*, 2008). Quant aux types de morts cellulaires induites par la thérapie photodynamique, il s'agit principalement de l'apoptose, parfois de la nécrose. Le type de mort cellulaire induit par la thérapie photodynamique dépend de la nature des sensibilisateurs, de la dose d'énergie lumineuse, de la durée d'incubation des cellules avec le sensibilisateur et du type cellulaire (CHAN, *et al.*, 2000); (DELLINGER, 1996); (FABRIS *et al.*, 2001); (ROUSSET *et al.*, 2000); (WYLD *et al.*, 2001). Certains auteurs mentionnent et caractérisent d'autres types de morts cellulaires encore controversées. Certains de ces types de morts cellulaires s'apparentent à des combinaisons entre deux types, par exemple une apoptose incomplète qui se termine en nécrose probablement en raison d'un manque d'énergie de la cellule pour compléter la séquence apoptotique (HSIEH *et al.*, 2003).

La localisation du sensibilisateur dans les cellules détermine aussi le type de mort cellulaire. Les dommages générés à des sites subcellulaires distincts en thérapie photodynamique pourraient déclencher des mécanismes distincts de mort cellulaire. Par exemple, des sensibilisateurs localisés à la membrane cellulaire causeraient des pores dans la membrane cellulaire et mèneraient à la nécrose; des

sensibilisateurs localisés dans l'appareil de Golgi provoqueraient la formation de vacuoles et un phénomène de rétrécissement/fragmentation de la cellule (HSIEH *et al.*, 2003). De surcroît, la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) au site de localisation du sensibilisateur active des voies de signalisation intracellulaire pouvant mener à l'apoptose, néanmoins, selon le sensibilisateur utilisé, le programme d'apoptose n'est pas toujours complété. Lorsque le sensibilisateur est situé à la membrane cellulaire, les voies de signalisation déclenchées sont : JNK et la caspase-3, le clivage de PARP et PAK2, puis indirectement la perte de la perméabilité de la membrane mitochondriale. Un stress oxydatif important, comme un excès d'espèces réactives de l'oxygène générées à la mitochondrie (par un sensibilisateur localisé sur ou dans la mitochondrie par exemple) peuvent aussi affecter la perméabilité des membranes mitochondriales. La perte de perméabilité de la membrane mitochondriale est associée avec une dysfonction de la mitochondrie, détectable lors de l'apoptose et de la nécrose (HSIEH *et al.*, 2003); (HIRSCH *et al.*, 1997); (KROEMER *et al.*, 1997).

1.3.1. L'apoptose

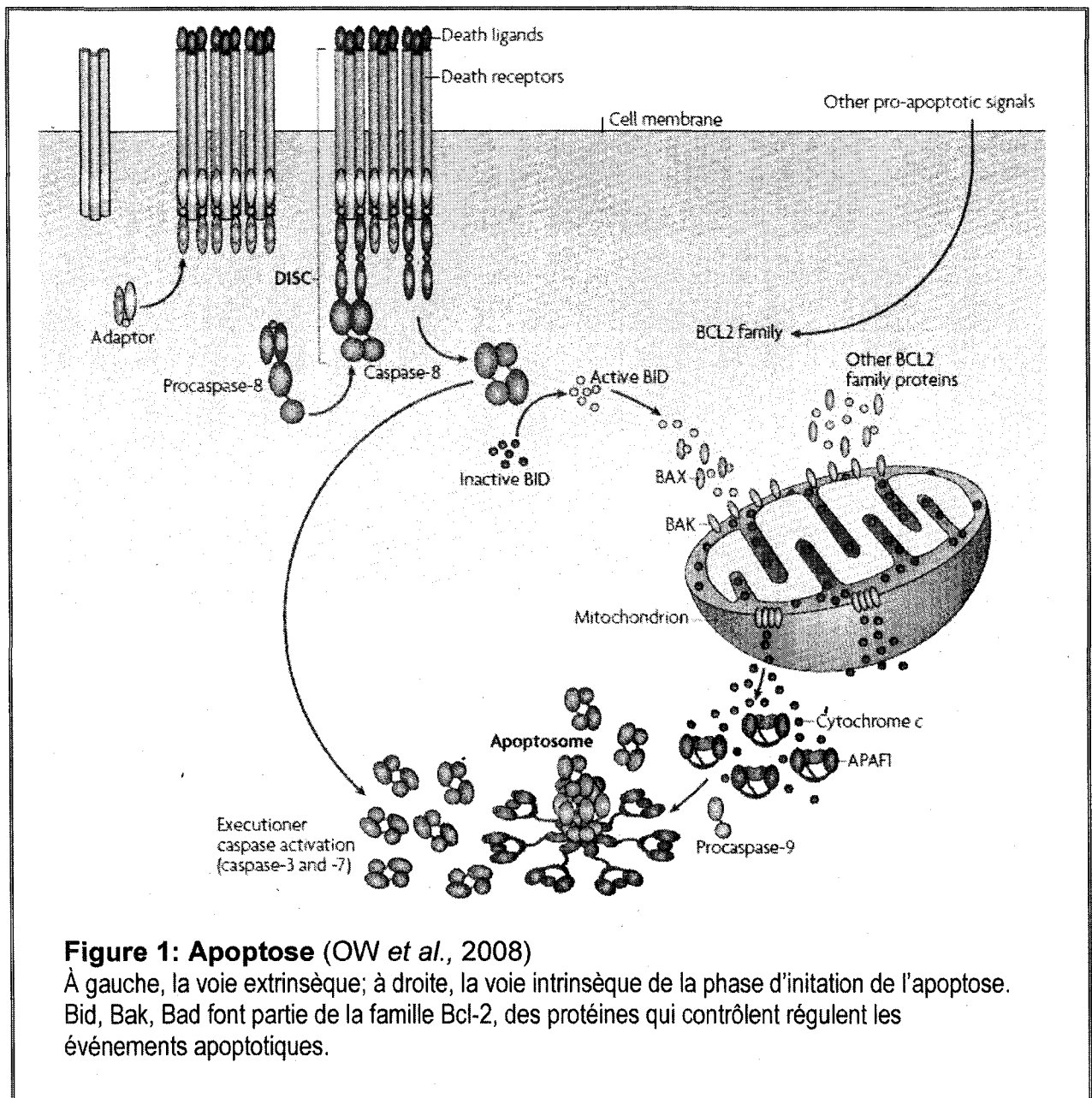
L'apoptose constitue le plus connu des types de morts cellulaires programmées. Les deux principales voies apoptotiques s'appellent la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) et la voie extrinsèque. Ces deux voies peuvent être reliées et les molécules impliquées dans une voie peuvent influencer l'autre voie. Il existe aussi une troisième voie, la voie perforine/granzyme. Puisque cette dernière implique les lymphocytes T, elle ne sera pas détaillée dans cet ouvrage, car il est peu probable que cette voie de l'apoptose soit pertinente pour la thérapie photodynamique ou pour la radiothérapie.

La voie intrinsèque est déclenchée par des stimuli qui initient à la mitochondrie des signaux intracellulaires sans passer par les récepteurs de mort cellulaire à la membrane plasmique. Ces stimuli peuvent agir de manière négative ou positive. « De manière négative » signifie l'absence d'un signal (facteur de croissance, hormone ou cytokine) de survie pour inhiber l'apoptose, par conséquent un

stimulus négatif déclenche par défaut l'apoptose. « De manière positive » signifie la présence d'un signal (radiations ionisantes, toxines, hypoxie, hyperthermie, infection virale, radicaux libres) qui déclenche l'apoptose en réponse à des dommages cellulaires. Tous ces stimuli causent des changements dans la membrane mitochondriale interne qui résultent en l'ouverture des canaux transmembranaires responsables de la transition de perméabilité, perte du potentiel membranaire mitochondrial et la relâche dans le cytosol des deux principaux groupes de protéines pro-apoptotiques normalement séquestrées dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Le premier groupe inclut le cytochrome *c*, SMAC/DIABLO et la sérine protéase HtrA2/Omi. Le cytochrome *c* lie et active Apaf-1 et la procaspase-9 pour former l'apoptosome. Le deuxième groupe inclut AIF, l'endonucléase G et CAD, qui sont relâchés tardivement dans le processus de l'apoptose. AIF transloque au noyau et cause la fragmentation de l'ADN et la condensation de la chromatine nucléaire périphérique. L'endonucléase G transloque aussi au noyau où elle clive la chromatine nucléaire en fragments d'ADN oligonucléosomaux. CAD est ensuite relâchée de la mitochondrie et transloque au noyau où elle est clivée par la caspase-3 puis provoque la fragmentation de l'ADN oligonucléosomal et une condensation plus prononcée et plus avancée de la chromatine (ELMORE, 2007).

La voie extrinsèque est déclenchée par des stimuli qui impliquent des interactions entre ligands et récepteurs transmembranaires de mort cellulaire à la membrane plasmique. Ces récepteurs de mort cellulaire font partie de la superfamille de récepteurs TNF (Tumor Necrosis Factor), qui possèdent tous des domaines extracellulaires riches en cystéines et des « domaines de mort » cytoplasmiques d'environ 80 acides aminés. Lorsque le ligand se lie au récepteur de mort cellulaire à la surface de la cellule, une ou des protéines adaptatrices sont recrutées à partir du cytoplasme pour se lier aux « domaines de mort » du récepteur. La protéine adaptatrice s'associe à la procaspase-8 grâce à la dimérisation des « domaines de mort effecteurs ». Le DISC (death-inducing signal complex) est ainsi formé et il en résulte une

activation auto-catalytique de la procaspase-8. Une fois la caspase-8 activée, la phase d'exécution de l'apoptose est déclenchée (ELMORE, 2007).



L'apoptose se divise en trois phases: l'initiation, l'exécution et la dégradation. L'initiation peut emprunter la voie intrinsèque, ou la voie extrinsèque ou la voie perforine/granzyme. L'exécution est la phase commune où se confirme la décision d'entreprendre ou non le processus de mort cellulaire programmée et organisée. La dégradation consiste en l'activation d'hydrolases cataboliques, de caspases et de

nucléases. La phase de dégradation est nécessaire à l'acquisition des caractéristiques morphologiques d'une apoptose complète (COSTANTINI *et al.*, 2000); (KROEMER *et al.*, 1997).

Les caspases sont les principaux exécutants de l'apoptose. Les caspases, des cystéine-protéases, clivent leurs nombreux substrats après un résidu aspartate. On peut les classifier en deux groupes, selon leur spécificité de substrat et la longueur de leur prodomaine. Les caspases initiatrices -2, 8, 9 et 10 activent les caspases effectrices (phase d'exécution). Les caspases effectrices -3, 6 et 7, clivent les cibles cellulaires responsables de la mort cellulaire (COSTANTINI *et al.*, 2000); (YANG *et al.*, 2003). Il existe aussi les caspases inflammatoires -1, -4, -5, ainsi que d'autres caspases -11, -12, -13, -14 impliquées dans des cas plus particuliers d'apoptose (ELMORE, 2007).

La figure 2 illustre les changements morphologiques lors de l'apoptose. Au début du processus de l'apoptose, on peut observer en microscopie électronique le rétrécissement de la cellule, avec un cytoplasme et des organelles plus denses, ainsi que la pyknose, résultante de la condensation de la chromatine et caractéristique de l'apoptose. Ensuite le processus de bourgeonnement s'enclenche. Lors du bourgeonnement, la membrane plasmique forme des vésicules, le noyau se fragmente et dissémine des débris de chromosomes dans le cytoplasme (caryorrhexis), puis la cellule se sépare en corps apoptotiques à la manière d'un bourgeonnement. Les corps apoptotiques sont par la suite phagocytés et digérés par des macrophages, des cellules parenchymales ou des cellules tumorales, ne causant aucune inflammation (ELMORE, 2007). Cette absence de réaction inflammatoire suscite un vif intérêt envers le développement de molécules capables d'induire l'apoptose spécifiquement chez les cellules cancéreuses.

Plusieurs stimuli tels la chaleur, les radiations ionisantes, l'hypoxie et des drogues anticancer cytotoxiques peuvent induire l'apoptose, ou à plus forte dose induire la nécrose.

1.3.2. La nécrose et l'oncose

La nécrose se manifeste par un gonflement de la cellule, une dilatation des organelles et du cytoplasme, une vésiculation et la dégradation aléatoire de l'ADN. Le contenu cellulaire se déverse dans l'environnement, provoquant une réaction inflammatoire après la lyse cellulaire (JONATHAN *et al.*, 1999). La nécrose est causée par deux mécanismes : un dommage direct aux membranes cellulaires ou un épuisement avec les sources d'énergie (ATP) de la cellule (ELMORE, 2007).

On utilise parfois dans la littérature le terme « oncose » plutôt que « nécrose ». L'oncose présente un gonflement de la cellule, un dysfonctionnement des pompes ioniques membranaires et une lyse cellulaire normalement attribués à la nécrose. Toutefois, l'oncose se déroule plus rapidement et présente une lyse de la chromatine et l'implication potentielle de certains facteurs apoptotiques, comme les caspases (ABEND, 2003); (FAVAUDON, 2000); (LEMAY, 2008); (ELMORE, 2007).

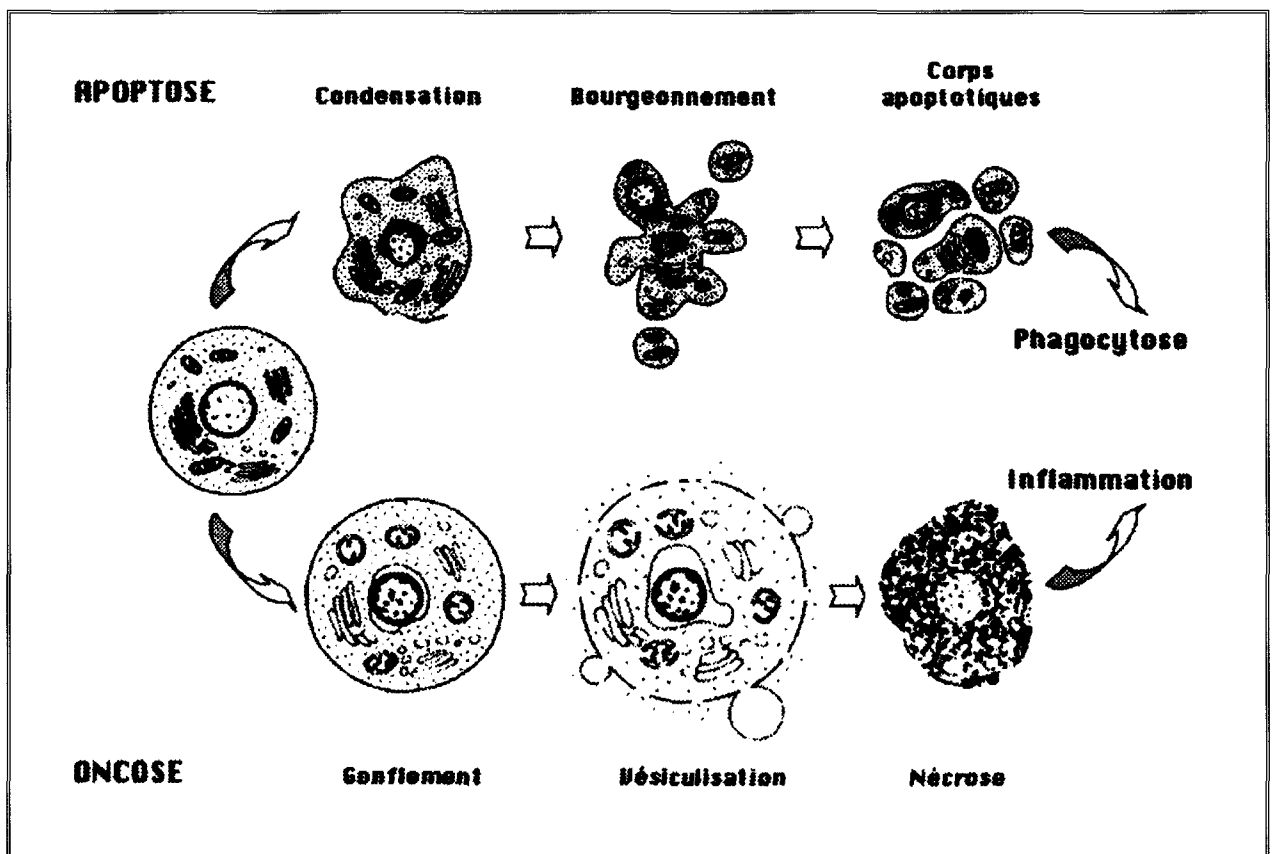


Figure 2 : Apoptose et oncose: changements morphologiques (TUBIANA *et al.*, 2008)
La figure ci-dessus résume les principaux changements morphologiques observables lors du processus de l'apoptose et de l'oncose (aussi communément appelée nécrose).

1.3.3. La sénescence

La sénescence est typique de certains types cellulaires, comme des fibroblastes irradiés (HENNEQUIN *et al.*, 2008) et des cellules épithéliales endommagées (VICENCIO *et al.*, 2008). La sénescence cellulaire réfère à l'arrêt du cycle cellulaire en phase G₁ chez des cellules qui proliféraient constamment. Autrement dit, la cellule sénescence demeure dans l'organisme, continue d'être métaboliquement active et d'effectuer certaines fonctions, mais elle cesse de se reproduire, car son cycle cellulaire est arrêté. La sénescence est une réponse de la cellule suite à un stress pouvant mener à sa transformation maligne : raccourcissement des télomères, dommages à l'ADN et stress oxydatif. Ces différents stimuli peuvent déclencher 2 principales voies de la sénescence : p53 et pRB (VICENCIO *et al.*, 2008). Dans la voie p53, lorsque la dégradation de p53 est inhibée en réponse à un stress, p53 active p21, qui arrête le cycle cellulaire. Dans la voie pRB, en réponse à un stress la protéine p16 active pRB, qui à son tour se lie à des facteurs de transcription de la famille E2F, qui ensuite régulent la progression du cycle cellulaire. Ces deux voies peuvent communiquer entre elles ou avec d'autres voies de mort cellulaire comme l'apoptose (VICENCIO *et al.*, 2008).

Morphologiquement, la cellule sénescence est plus large et aplatie. Elle exprime certains marqueurs moléculaires tels la β -galactosidase associée à la sénescence, des foci d'hétérochromatine associés à la sénescence et l'accumulation de granules de lipofuscine (VICENCIO *et al.*, 2008).

On a longtemps considéré ce type de mort comme étant permanente. Cependant, certains cas de reprise de la croissance après un arrêt de prolifération *in vitro* pendant 30 à 45 jours post-irradiation ont été rapportés, indiquant un arrêt de prolifération temporaire (SCHMIDT-ULLRICH *et al.*, 1992). Ce retour à la prolifération de cellules classées sénescences suggère que les radiations peuvent induire une quiescence prolongée. Un tel phénomène expliquerait des cas de récurrence d'un cancer après quelques années de rémission apparente. Il importe donc de mettre au point des sensibilisateurs qui aideront à éradiquer davantage de cellules cancéreuses.

1.3.4. L'autophagie

L'autophagie est un processus caractérisé par l'involution des corps de Golgi, des polyribosomes, du réticulum endoplasmique et des mitochondries. L'autophagie met en oeuvre les cathepsines et requiert l'activation des lysosomes (HENNEQUIN *et al.*, 2008). L'autophagie fait partie des types de morts cellulaires programmées et se divise en quatre étapes : 1) induction, 2) formation de l'autophagosome, 3) fusion avec un lysosome ou une vacuole, 4) dégradation et recyclage. L'autophagie peut conduire à la mort de la cellule lorsqu'elle est soumise à un stress oxydatif important. Néanmoins, l'autophagie peut souvent s'avérer un mécanisme de survie adaptatif qui tente de rescaper la cellule de la mort cellulaire ou de « rajeunir » la cellule en renouvelant ses organelles et/ou ses protéines de longue durée de vie (VICENCIO *et al.*, 2008). Par exemple, l'élimination par autophagie de mitochondries endommagées prévient la relâche par ces mitochondries de facteurs pro-apoptotiques, prévenant l'apoptose (ELMORE, 2007). L'autophagie est une alternative antagoniste de l'apoptose radio-induite et pourrait contribuer à la radiorésistance (TUBIANA *et al.*, 2008).

1.3.5. La mort immédiate

Autrefois confondue avec l'apoptose, la mort immédiate survient chez des cellules endothéliales dans les quelques heures ou minutes suivant une irradiation à très haute dose (>10 Gy). Elle est amorcée par une hyperactivation de PARP-1, qui induit une élongation des polymères d'ADP-ribose. Rapidement, les réserves de NAD⁺ de la cellules s'épuisent, la chaîne respiratoire mitochondriale est disloquée, l'ATP disponible diminue et la cellule meurt. On observe une perte de l'intégrité membranaire des cellules, l'activation des lysosomes et une dégradation rapide des organites intracellulaires, surtout les mitochondries. Morphologiquement, la mort immédiate est comparable à l'oncose (nécrose) (TUBIANA *et al.*, 2008); (HENNEQUIN *et al.*, 2008).

1.3.6. La mort mitotique et la mort différée

La mort mitotique constitue le type de mort cellulaire prépondérant dans les cellules tumorales épithéliales. La mort mitotique est associée à des erreurs dans la mitose post-irradiation donnant naissance à des cellules micronucléées avec de larges chromosomes non-condensés et/ou des cellules polyploïdes ou binucléées. Le processus s'achève par une lyse cellulaire avec perméation de la membrane plasmique. Certains considèrent que la mort mitotique est incluse dans la catégorie « apoptose », argumentant que plusieurs caractéristiques de l'apoptose y sont observées avant ou après la division cellulaire. À la suite de dommages radio-induits à l'ADN, les aberrations chromosomiques entraînent la mort cellulaire pendant l'initiation de la division cellulaire (TUBIANA *et al.*, 2008); (RONINSON *et al.*, 2001). D'un point de vue morphologique, on observe que le noyau conserve un aspect normal jusqu'aux étapes tardives du processus, qui se termine par une dégradation de l'ADN (TUBIANA *et al.*, 2008).

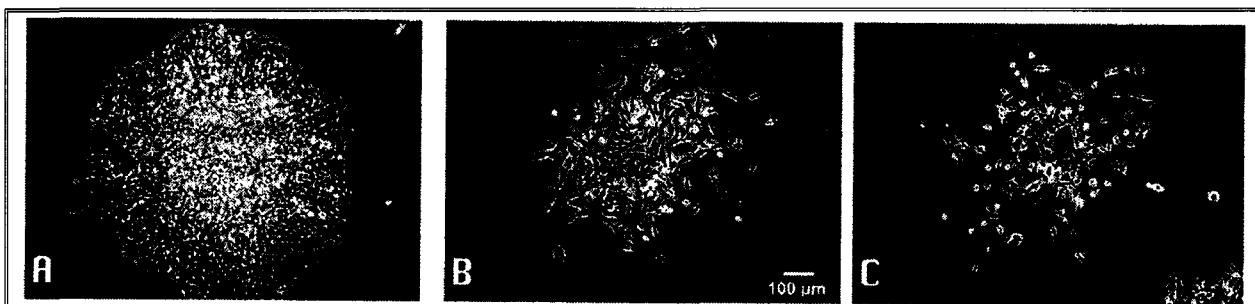


Figure 3: Mort différée (TUBIANA *et al.*, 2008); (PONETTE *et al.*, 2000)

Essai clonogénique avec des fibroblastes de hamster chinois V79 observées en contraste de phase

A: cellules non irradiées qui ont engendré une colonie

B et C : cellules irradiées qui ont engendré une microcolonie

La mort différée ressemble beaucoup à la mort mitotique et dans certains textes est incluse dans la catégorie « mort mitotique ». Si l'on fait la distinction, on attribue le terme « mort différée » à des cellules capables de se diviser jusqu'à 5 générations après l'irradiation, engendrant des microcolonies (TUBIANA *et al.*, 2008). Les microcolonies sont des amas de moins de moins de 50 cellules observées dans un essai clonogénique. Dans le cas de la mort différée, la cellule subit des lésions plus bénignes qui ne

sont pas létales d'emblée : translocations, inversions, courtes délétions. Cette cellule en sursis peut transmettre les lésions non réparées à ses descendantes, engendrant une instabilité génomique (chromosomique). Au fil des générations, via le mécanisme d'échange de chromatides sœurs, les dommages s'accumulent et causent la mort des cellules lors de la division cellulaire. Les étapes finales de la mort différée peuvent ou non emprunter les voies de l'apoptose (HENNEQUIN *et al.*, 2008).

1.3.7. Types de mort cellulaire en radiothérapie

Les proportions de chacune de ces morts cellulaires dépendent de la dose d'irradiation, du type cellulaire, de l'intégrité de la protéine p53 et du débit de dose. Le type de mort cellulaire prépondérant est la mort mitotique chez les cellules tumorales épithéliales traitées en radiothérapie. L'apoptose radio-induite se développe en 6 à 72 heures, provoquée par le stress oxydatif (hypoxie, ischémie-reperfusion), l'hyperthermie et la présence de cassures double brin non réparées. Toutefois, 10% ou moins de la mortalité radio-induite est associée à l'apoptose. Quant à la sénescence radio-induite, elle survient chez les cellules normales, en particulier les fibroblastes, mais n'est que transitoire ou carrément absente chez les lignées de cellules tumorales dont p53 est défectueux (TUBIANA *et al.*, 2008). La mort immédiate survient surtout lorsque de fortes doses de radiation sont utilisées (HALL *et al.*, 2000); (TUBIANA *et al.*, 2008). Par conséquent, la mort immédiate, l'oncose et la nécrose se manifestent rarement aux doses d'irradiation cliniques, souvent fractionnées en faibles doses (exemple : 2 Gy par jour). Dans le présent ouvrage, la mort cellulaire induite par l'irradiation gamma a été mesurée grâce à un essai clonogénique qui mesure la survie globale des cellules en tenant compte de tous les types de morts cellulaires radio-induites.

1.3.8. Types de mort cellulaire en thérapie photodynamique

Le principal médiateur de la mort cellulaire en thérapie photodynamique est l'oxygène singulet. L'oxygène singulet déclenche principalement l'apoptose chez les cellules cancéreuses traitées (GODAR, 2000); (SHARMAN *et al.*, 2000). Quelques études ont rapporté de la nécrose ou un phénomène hybride

entre l'apoptose et la nécrose, probablement en raison d'un manque d'énergie de la cellule pour compléter la mort programmée par apoptose (AHMAD *et al.*, 2000); (CHAN *et al.*, 2000); (DELLINGER, 1996); (HSIEH *et al.*, 2003); (LI *et al.*, 2007). Dans le présent ouvrage, la mort cellulaire engendrée par la thérapie photodynamique a été mesurée grâce à un essai MTT qui mesure l'activité métabolique des cellules vivantes via la formation de formazan; c'est-à-dire un indicateur de la survie des cellules sans apoptose et sans nécrose (GERLIER *et al.*, 1986). Ce test a été utilisé parce qu'il est plus rapide et plus simple à effectuer que l'essai clonogénique.

2. Survol de l'arsenal disponible contre le cancer

Les améliorations techniques apportées aux méthodes diagnostiques, combinées à des programmes d'informations publiques pour inciter les gens à participer aux dépistages précoces, ont permis de détecter des cancers à des stades plus précoces avec un meilleur pronostic. Le cancer du sein par exemple, si détecté avant l'apparition de métastases, peut être traité en chirurgie conservatrice d'une bonne partie du tissu mammaire, combinée à un traitement de radiothérapie. Cela est très bien, mais comme on le verra plus loin, des améliorations aux traitements disponibles sont nécessaires pour diminuer les taux de récurrence.

2.1. Chirurgie de résection

La tumorectomie consiste à retirer chirurgicalement la tumeur bénigne ou cancéreuse ainsi qu'une marge de tissu sain d'une épaisseur variable entourant la tumeur (marge de résection) afin de s'assurer de retirer toutes les cellules cancéreuses possiblement situées localement. La tumorectomie est pratiquée couramment pour plusieurs types de cancers solides.

Dans le cancer du sein par exemple, si la patiente le désire et/ou si la taille de la tumeur est assez petite comparativement à celle du sein, la chirurgie mammaire conservatrice est envisagée. Puisque la chirurgie mammaire conservatrice offre des avantages esthétiques et psychologiques, le choix est offert aux patientes. Une revue de plusieurs études cliniques randomisées démontre que pour des cancers du sein envahissants de stade précoce (I et II), on obtient des résultats comparables entre la mastectomie radicale modifiée (retrait complet du sein) comparée à la chirurgie mammaire conservatrice. Aucune différence significative n'a été trouvée en termes de survie globale et de survie sans récurrence distante, peu importe la durée de l'étude entre 5 et 20 ans de suivi des patientes, peu importe la durée de l'étude entre 5 et 20 ans de suivi des patientes (MCCREADY *et al.*, 2005).

La dissection axillaire (de l'aisselle) augmente les chances relatives de survie de 7% jusqu'à 46 %. Néanmoins, quelques autres études n'ont trouvé aucune amélioration significative. En général, la chirurgie mammaire conservatrice sera accompagnée d'une dissection axillaire et de radiothérapie adjuvante (MCCREADY *et al.*, 2005).

Après le retrait de la masse cancéreuse principale, un ou des traitements adjuvants sont nécessaires pour éliminer les cellules cancéreuses résiduelles. Les cellules cancéreuses résiduelles peuvent causer de la récurrence loco-régionale ou pire encore, des métastases. Les radiosensibilisateurs pourraient donc faire partie des traitements adjuvants de premier choix pour aider à éliminer les cellules cancéreuses résiduelles.

2.2. Chimiothérapie

La chimiothérapie consiste en un traitement par des substances chimiques, en particulier en oncologie. Dans la classification pharmacothérapeutique des médicaments selon *Santé Canada*, tous les médicaments de la classe « 10.00 Antinéoplasiques » constituent des agents de chimiothérapie, en plus

de quelques autres. On peut aussi classer en trois principales catégories les principaux médicaments utilisés en chimiothérapie : les agents cytotoxiques, les hormones, les modificateurs de la réponse biologique.

2.2.1. Les agents cytotoxiques

Les agents cytotoxiques consistent en des molécules toxiques pour les cellules cancéreuses et malheureusement, souvent aussi toxiques pour d'autres cellules saines, d'où les effets secondaires comme l'immunosuppression, la nausée, la perte de cheveux, l'anémie et la fatigue.

Parmi les agents cytotoxiques, on retrouve plusieurs complexes de coordination du platine qui sont présentement évalués pour leur potentiel radiosensibilisateur (HERMANN *et al.*, 2008); (KLEINBERG *et al.*, 2007). Malgré des résultats préliminaires encourageants quant à leur potentiel radiosensibilisant, leur utilisation est limitée par des effets secondaires graves :

- toxicité rénale et déséquilibres d'électrolytes qui s'ensuivent,
- neuropathie périphérique,
- myélosuppression, leucopénie, anémie et thrombocytopénie,
- toxicité du système auditif, incluant pertes de l'ouïe à hautes fréquences et tinnitus,
- certains cas de réactions anaphylactiques (CHABNER *et al.*, 2001).

Les effets secondaires des dérivés de porphyrines sans platine, à des doses radiosensibilisatrices, sont beaucoup moindres (photosensibilité de la peau) et cette tolérabilité justifie le développement de cette classe de radiosensibilisateurs.

2.2.2. Les limites et les effets secondaires de la chimiothérapie

Les agents chimiothérapeutiques s'avèrent d'une efficacité variable, surtout utiles pour traiter les cancers inopérables (organes vitaux touchés), ou avec métastases, ou les cancers liquides qui ne sont ni

localisés ni délimitables. Néanmoins, les effets secondaires systémiques modérés à sévères causés par la chimiothérapie diminuent drastiquement la qualité de vie des patients et requièrent plusieurs autres traitements concomitants pour apaiser les effets secondaires dont la nausée, la douleur, la fatigue extrême généralisée, l'immunodépression, le vieillissement prématuré, l'anémie. Somme toute, la chimiothérapie et le traitement de ses effets secondaires constituent des interventions coûteuses et pénibles. Malgré tout, on les utilise en raison de leur efficacité variable, à défaut d'avoir mieux à offrir. Les habitudes saines de prévention du cancer, les pratiques de détection précoce et les efforts de recherche et développement de traitements plus efficaces, plus spécifiques et donc avec moins d'effets secondaires doivent progresser dans l'espoir d'améliorer la qualité de vie et la survie des patients actuels et futurs. La thérapie photodynamique et la radiothérapie (combinée ou non à des radiosensibilisateurs) offrent des traitements avec de moindres effets secondaires.

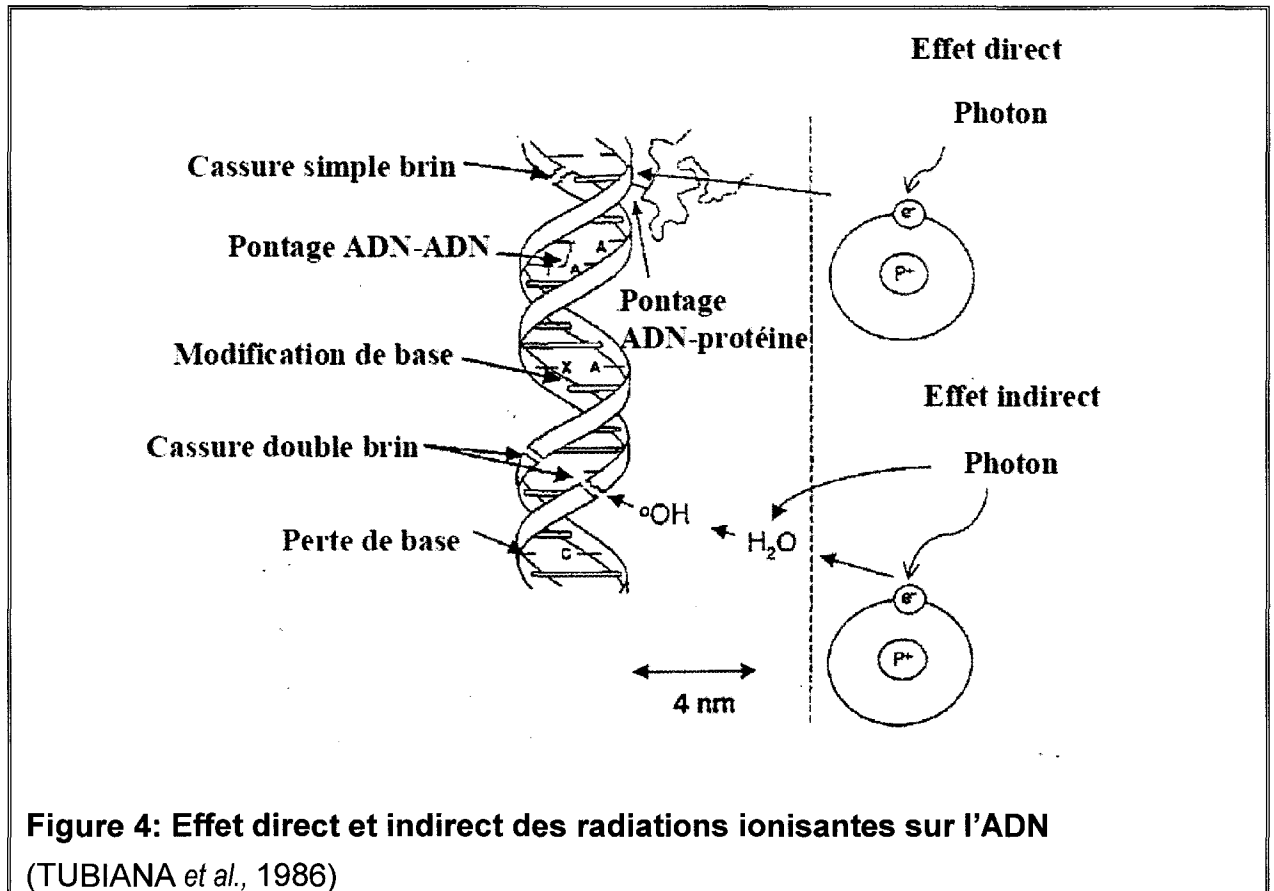
2.3. Radiothérapie

Tel que mentionné dans la section 2.1. *Chirurgie de résection*, dans les stades précoces de cancer du sein, on envisage souvent une thérapie mammaire conservatrice. La thérapie mammaire conservatrice consiste en une chirurgie mammaire conservant le plus possible le sein naturel (retirer la tumeur et une marge de résection) suivie d'un traitement de radiothérapie néo-adjuvante afin de détruire les cellules cancéreuses résiduelles (HIRAOKA *et al.*, 1997). La radiothérapie adjuvante fait partie du traitement de plusieurs autres types de cancers. Le traitement de radiothérapie typique s'étale sur cinq à sept semaines, fractionné en doses quotidiennes de 2 Gy à raison de cinq jours par semaine, pour une dose totale de 50 à 60 Gy (HALL, 2000).

2.3.1. Mécanisme d'action de la radiothérapie

En général, des rayons X ou des rayons gamma sont utilisés en radiothérapie : ce sont des sources de faible TEL (transfert linéaire d'énergie). L'utilisation de la radiation ionisante vise surtout à endommager, par effet direct et indirect, l'ADN des cellules cancéreuses. Tel qu'illustré à la figure 4, la radiation

ionisante peut déposer directement de l'énergie dans les molécules d'ADN et casser ses liaisons chimiques, endommageant ainsi directement l'ADN : c'est l'effet direct qui causerait de 30 à 40% des dommages par les rayons X et gamma (CHAPMAN *et al.*, 1973); (ROOTS *et al.*, 1975).



L'effet indirect cause la majorité des dommages à l'ADN : la radiation ionisante dépose de l'énergie dans les molécules d'eau environnantes et cause la radiolyse de l'eau. Lors de la radiolyse de l'eau, le surplus d'énergie brise les liaisons chimiques et génère des espèces radicalaires. Parmi les espèces radicalaires générées par les radiations à faible transfert linéaire d'énergie, le radical hydroxyl $\text{HO}\cdot$ s'avère le plus réactif en causant entre 60 et 70 % des dommages indirects aux cellules (CADET *et al.*, 1999); (WAGNER, 2006).

Lors du traitement, les tissus sains sont aussi irradiés, causant les effets secondaires de la radiothérapie. Afin de limiter la dose reçue aux tissus sains, on fractionne la dose de radiations. Les cellules saines pouvant réparer plus efficacement les dommages à leur ADN que les cellules cancéreuses, un fractionnement de la dose optimise le ratio de survie : on maximise la survie des cellules normales et on induit une mortalité importante chez les cellules cancéreuses. De surcroît, ce fractionnement permet à la tumeur de se réoxygéner, contribuant à augmenter la sensibilité des cellules cancéreuses aux doses subséquentes de radiation (HALL, 2000). Une étude récente suggère même que la réoxygénation induite par la radiothérapie diminue la malignité des cellules tumorales restantes en cours de traitement comparativement aux zones plus hypoxiques, pour des tumeurs de la tête et du cou (THORWARTH *et al.*, 2007).

2.3.2. Les limites de la radiothérapie

La radiothérapie se veut un traitement local, approprié pour des tumeurs solides et leur marge de résection. Les cancers liquides non localisés (ex : leucémies) doivent plutôt être traités par chimiothérapie. Étant un traitement local, la radiothérapie n'est d'aucun secours pour traiter les micrométastases distantes en développement ailleurs dans le corps qui n'ont pas été détectées par imagerie médicale. C'est la raison pour laquelle des médecins prescrivent parfois préventivement de la chimiothérapie.

Quant aux cancers situés sur ou dans des organes vitaux, la radiothérapie comporte des risques et beaucoup de précautions doivent être prises pour éviter la mort du patient si on choisit la radiothérapie comme modalité de traitement. Par exemple, le cerveau s'avère un organe particulièrement difficile à traiter lorsqu'il est atteint par le cancer (tumeur primaire ou métastases). Les lésions à cet organe sont irréversibles et peuvent diminuer drastiquement l'autonomie et la qualité de vie des patients, voire carrément causer leur mort. La chirurgie constitue donc une opération risquée, délicate et sans garantie.

La barrière hématoencéphalique limite l'accès aux agents chimiothérapeutiques. À ce propos, des efforts de recherche prometteurs se dévouent actuellement à mettre au point l'ouverture de la barrière hématoencéphalique pour y acheminer les agents chimiothérapeutiques (BELLAVANCE *et al.*, 2008). Quant à la radiothérapie, une irradiation du cerveau (totale ou partielle) pourrait causer des dommages irréversibles. Des appareils de radiochirurgie très précis, comme le *Gamma knife™*, permettent désormais de traiter des tumeurs ≤ 3 cm de diamètre au cerveau tout en épargnant tant que possible le tissu sain, si leur volume est bien délimité. Des études cliniques ont montré que l'irradiation au *Gamma knife™* ≥ 18 Gy réduisait drastiquement la récurrence. Avec le traitement au *Gamma knife™*, $\geq 70\%$ de contrôle local a été obtenu, alors que l'ajout de radiothérapie du cerveau au complet (XRT) n'apportait aucune amélioration significative (IWAI *et al.*, 2008); (JAWAHAR *et al.*, 2002). Une résection chirurgicale suivie de radiothérapie adjuvante s'avère plus efficace que la radiothérapie seule ou la chirurgie seule pour traiter des métastases au cerveau. Une étude randomisée multicentrique a montré que la récurrence était moins fréquente chez le groupe avec radiothérapie (18%) comparé au groupe sans radiothérapie (70%) avec $p < 0,001$ (PATCHELL *et al.*, 1998). Néanmoins, il y a place à amélioration : un taux de 18 % de récurrence justifie de continuer les recherches pour diminuer davantage la récurrence. Le développement de radiosensibilisateurs s'avère une voie prometteuse pour réduire davantage la récurrence dans les cancers au cerveau et autres organes vitaux. La mise au point de l'ouverture de la barrière hématoencéphalique faciliterait l'acheminement de radiosensibilisateurs pour traiter les cancers au cerveau.

En radiothérapie avec des doses fractionnées, il est difficile de traiter avec précision les organes qui bougent : le foie et la prostate sont des organes mous pouvant se déplacer légèrement d'un jour à l'autre selon la position couchée, l'utérus se déplace graduellement en fonction du cycle menstruel, le côlon est un organe mou et motile, les poumons bougent au rythme de la respiration, etc. Il est possible de prescrire une marge de traitement beaucoup plus grande pour s'assurer que la tumeur à traiter soit

maintenue dans la zone irradiée, mais cela implique qu'un volume important de tissu sain soit irradié inutilement. Trois pistes de solutions peuvent surmonter ce problème :

- des radiosensibilisateurs efficaces, permettant d'augmenter l'effet thérapeutique de la radiothérapie tout en minimisant la dose d'irradiation nécessaire, ce qui diminue aussi la dose reçue dans les tissus sains environnants;
- des photosensibilisateurs permettant de traiter sélectivement le cancer de surface sans irradier les tissus sains environnants grâce à une source lumineuse acheminée par une sonde dans un orifice naturel. Cette solution ne s'applique que pour les cancers situés à ≤ 6 mm de la surface, comme les cancers du système digestif;
- un système de positionnement par imagerie médicale (CURY *et al.*, 2006); (FRAZIER *et al.*, 2004); (VICINI *et al.*, 2003).

2.3.3. Les effets secondaires de la radiothérapie

Une méta-analyse de 40 études cliniques incluant 20 000 patientes traitées pour un cancer du sein indique une nette réduction absolue de 19.7% du risque de récurrence locale grâce à la radiothérapie, soit une réduction du 2/3 par rapport aux patientes sans radiothérapie. Toutefois, il est intrigant de constater qu'il n'y a aucune différence significative dans leur survie globale dans les 20 années suivant le traitement de radiothérapie. Quant aux taux de décès sur 20 ans exclusivement liés au cancer du sein, la radiothérapie n'offre que 4,8% d'amélioration absolue par rapport aux patientes qui n'ont pas reçu de radiothérapie adjuvante (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP, 2000). On en déduit que plusieurs patientes sont décédées en raison de récurrence à distance de leur cancer. Des radiosensibilisateurs permettraient d'éliminer davantage de cellules cancéreuses résiduelles, d'où une réduction de la récurrence locale et distante. Ainsi, des radiosensibilisateurs pourraient réduire davantage la mortalité liée au cancer du sein chez les patientes recevant de la radiothérapie.

Les effets secondaires les plus connus de la radiothérapie sont la fibrose du tissu sain environnant, l'athérosclérose radio-induite et le télangiectasia. Dans la méta-analyse citée ci-haut, on remarque en effet une augmentation relative de 30% de mortalité cardio-vasculaire chez les femmes ayant été traitées par la radiothérapie, découlant fort probablement de l'athérosclérose radio-induite. Chez les femmes traitées en radiothérapie, les autres causes de mortalité étaient légèrement supérieures, mais non significatives dix ans après la radiothérapie (EARLY BREAST CANCER TRIALISTS' COLLABORATIVE GROUP, 2000). Une autre étude clinique démontre l'augmentation de mortalité pour causes cardiovasculaires découlant de la radiothérapie, tout en mettant en évidence les bénéfices de la radiothérapie pour la survie sans récurrence de cancer du sein. On y recommande d'adopter des protocoles de radiothérapie réduisant la dose de radiations au cœur et aux artères principales (CUZICK *et al.*, 1994). Des études chez la souris confirment que la radiothérapie par doses fractionnées induit l'athérosclérose et la plaque inflammatoire chez la souris (HOVING *et al.*, 2008). L'utilisation de radiosensibilisateurs permettrait de réduire les doses d'irradiation au total et ainsi de réduire la dose de radiation au système cardiovasculaire pour une même efficacité thérapeutique. Quant aux complications esthétiques à long terme comme la fibrose et le télangiectasia qui ne menacent guère la survie, les études récentes annoncent la bonne nouvelle : certains facteurs de risque comme le tabagisme ont été identifiés et peuvent être contrôlés par les patientes (LILLA *et al.*, 2007).

De plus en plus de recherches indiquent que la radiothérapie pourrait stimuler l'invasion et le potentiel métastatique des cellules cancéreuses en activant certaines molécules-clefs (MADANI *et al.*, 2008). Par exemple, l'irradiation de cellules de gliomes de rat à des doses sub-léthales a résulté en la formation accrue de tumeurs satellites après leur injection dans le striatum de cerveaux de rats (PARK *et al.*, 2006); (WILD-BODE *et al.*, 2001); (ZHAI *et al.*, 2006). L'augmentation radio-induite de l'expression de métalloprotéinases de matrice (MMP) et de l'invasion accrue qui s'ensuit ont été rapportées pour plusieurs types cellulaires cancéreux : cancer du pancréas (OHUCHIDA *et al.*, 2004); (QIAN *et al.*,

2002), mélanomes (KALISKI *et al.*, 2005), cancer rectal (SPEAKE *et al.*, 2005), cancer du côlon et ostéosarcomes (WANG *et al.*, 2000). Pour toutes les études précédentes, l'augmentation de l'invasion a été mesurée après l'irradiation des cellules cancéreuses.

Le Matrigel constitue un modèle *in vitro* qui reconstitue les composantes de la matrice extracellulaire, tel que dans le tissu sain entourant une tumeur cancéreuse. L'irradiation de Matrigel stimule l'invasion de cellules non-irradiées de carcinomes mammaires par l'intermédiaire de certaines MMPs (PAQUETTE *et al.*, 2007). Le même phénomène a été tout récemment mis en évidence *in vivo* chez des souris Balb/c saines dont les cuisses ont été irradiées avant même d'y implanter des cellules de carcinome mammaire en sous-cutané (LEMAY *et al.*, (submitted)); (PAQUETTE *et al.*, 2008).

L'athérosclérose et l'invasion radio-induites pourraient expliquer les résultats paradoxaux obtenus pour la survie globale au cancer du sein, malgré la radiothérapie. En effet, les métastases et l'invasion sont plus mortelles que la récurrence locale en général. Dans ces cas où l'irradiation du tissu sain augmenterait significativement l'invasion par les cellules cancéreuses résiduelles, les radiosensibilisateurs permettraient de réduire considérablement la dose de radiation au tissu sain tout en éliminant plus efficacement les cellules cancéreuses résiduelles avant qu'elles ne fassent de l'invasion ou des métastases.

2.4. Radiosensibilisateurs et radiosensibilisants

Les agents radiosensibilisants correspondent à des agents dont l'effet cytotoxique s'additionne à l'effet des radiations. Les radiosensibilisateurs consistent en des molécules qui augmentent les effets des radiations ionisantes sur les cellules en augmentant la génération des espèces réactives de l'oxygène (ROS) produits par les radiations. En voici un bref historique :

- 1958 Heidleberger introduit le concept de radiosensibilisateur à la suite de ses études précliniques avec des pyrimidines fluorées.
- 1964 Moertel *et al.* rapportent une amélioration de la survie des patients avec cancers gastro-intestinaux lorsque la chimiothérapie et la radiothérapie sont combinées.
- 1974 Nigro *et al.* attirent l'attention avec leur étude clinique du 5-fluorouracil en combinaison avec la mitomycine C et la radiothérapie.
- 1992-présent Plusieurs études rapportent les bénéfices de la combinaison d'agents chimiothérapeutiques avec la radiothérapie pour plusieurs types de cancers, notamment des cancers gastro-intestinaux, des poumons, de l'utérus (KVOLS, 2005). Toutefois, aucun radiosensibilisateur n'a été officiellement approuvé en clinique jusqu'à présent.

Tableau 1 : Principaux agents non dérivés de porphyrines étudiés jusqu'à présent comme radiosensibilisants ou radiosensibilisateurs potentiels (BRUNNER *et al.*, 2003); (CECCHINI *et al.*, 2004); (CECCHINI *et al.*, 2005); (CHABNER *et al.*, 2001); (FULLER *et al.*, 2008); (GIOVANNETTI *et al.*, 2007); (KVOLS, 2005); (WITTE *et al.*, 2005)

MOLÉCULE	MÉCANISMES D'ACTION PROPOSÉS	PROBLÈMES
Analogues halogénés de la thymidine (5FU, BrdUrd, ...)	<ul style="list-style-type: none"> • inhibent la thymidilate synthétase • s'incorporent dans l'ADN : effet radiosensibilisateur surtout dans les régions simple brin de l'ADN • causent la réticulation inter brin (mieux connue sous le nom <i>Interstrand Cross-Link</i>) 	<ul style="list-style-type: none"> • courte demi-vie plasmatique : infusion intraveineuse en continu pendant 5 à 6 semaines, prédisposant les patients à la thrombose et aux infections • nausée, diarrhée, ulcérations des muqueuses gastro-intestinales • myélosuppression • leucopénie • thrombocytopénie • anémie • séquelles dermatologiques indésirables • cardiotoxicité
Gemcitabine (analogue halogéné de la cytosine)	<ul style="list-style-type: none"> • inhibe la ribonucléotide réductase (requiert la déplétion des réserves d'ATP) • inhibe la polymérisation de l'ADN 	<ul style="list-style-type: none"> • myélosuppression • asthénie • syndrome similaire à la grippe • élévation des transaminases du foie

MOLÉCULE	MÉCANISMES D'ACTION PROPOSÉS	PROBLÈMES
Analogues au platine (cisplatine, oxaliplatine, ...)	<ul style="list-style-type: none"> • augmentent la formation d'intermédiaires toxiques du platine en présence de radicaux libres • inhibent la réparation de l'ADN • augmentation radio-induite de l'absorption de platine par les cellules • arrêtent le cycle cellulaire • certains inhibent la thiorédoxine réductase 	<ul style="list-style-type: none"> • toxicité rénale et déséquilibres d'électrolytes qui s'ensuivent, • neuropathie périphérique, • myélosuppression, leucopénie, anémie et thrombocytopénie, • toxicité du système auditif, incluant pertes de l'ouïe à hautes fréquences et tinnitus, • certains cas de réactions anaphylactiques.
Inhibiteurs de la topoisomérase I (camptothécine, topotecan, ...)	<ul style="list-style-type: none"> • empêchent le clivage de brin d'ADN nécessaire à la réparation de l'ADN 	<ul style="list-style-type: none"> • neutropénie • thrombocytopénie • anémie • effets secondaires gastro-intestinaux : diarrhée, nausée, mucosite, vomissements • élévation des transaminases • fatigue • fièvre • érythème (éruption cutanée)
Bloqueurs des récepteurs de la famille EGFR	<ul style="list-style-type: none"> • promeuvent l'apoptose radio-induite • inhibent la prolifération et redistribuent les phases du cycle cellulaire • inhibent l'angiogenèse • inhibent la réparation des dommages 	<ul style="list-style-type: none"> • cardiotoxicité • seules les cellules cancéreuses exprimant ces récepteurs spécifiques sont susceptibles à ce traitement

MOLÉCULE	MÉCANISMES D'ACTION PROPOSÉS	PROBLÈMES
Inhibiteurs de la farnésyltransférase	<ul style="list-style-type: none"> inhibent la phénylation de la protéine Ras, qui est responsable de la radiorésistance 	<ul style="list-style-type: none"> toxicité hématologique dans tous les essais cliniques
Inhibiteurs de la COX-2 (Celecoxib)	<ul style="list-style-type: none"> inhibent la synthèse de prostaglandines 	<ul style="list-style-type: none"> les inhibiteurs de COX-1 manquaient de spécificité envers les tumeurs, mais les inhibiteurs de COX-2 sont plus spécifiques augmentation du risque de problèmes cardiovasculaires
Bevacuzimab (et autres anticorps monoclonaux)	<ul style="list-style-type: none"> inhibent l'angiogenèse, privant ainsi la tumeur d'oxygène et de nutriments pour se développer 	<ul style="list-style-type: none"> induction de l'hypoxie de la tumeur : on sait que les cellules cancéreuses hypoxiques sont moins sensibles à la radiothérapie et on diminue ainsi son efficacité thérapeutique
Thalidomide	<ul style="list-style-type: none"> inhibe l'angiogenèse 	<ul style="list-style-type: none"> induction de l'hypoxie

La plupart des agents radiosensibilisants et radiosensibilisateurs potentiels causent plusieurs effets secondaires graves et une toxicité relativement importante. Les dérivés de porphyrines se démarquent par leur faible toxicité : le principal effet secondaire est la photosensibilité, qui peut aisément être évitée en portant des vêtements longs et en évitant l'exposition au soleil durant le traitement. Les dérivés de porphyrines offrent plusieurs caractéristiques du radiosensibilisateur idéal :

- toxicité minimale;
- accumulation dans les tumeurs à une concentration efficace;
- accumulation sélective dans les cellules malignes par rapport au tissu sain;
- administration possible à chaque traitement de radiothérapie, si nécessaire.

Le Photofrin II est déjà utilisé en clinique comme photosensibilisateur et est présentement évalué comme

radiosensibilisateur (KULKA *et al.*, 2003); (SCHAFFER *et al.*, 2002); (SCHAFFER *et al.*, 2003); (SCHAFFER *et al.*, 2006). Le Photofrin II est composé d'un mélange hétérogène de polymères d'hématoporphyrines : il contient des impuretés chimiques difficiles à séparer, ce qui en complique le contrôle qualité et la pharmacocinétique. Quelques groupes de scientifiques de recherche essaient donc de développer des radiosensibilisateurs chimiquement purs avec d'autres dérivés de porphyrines. Plusieurs paramètres sont à l'étude pour comprendre les modifications chimiques optimales, notamment : la charge, la nature du métal central, l'hydrophobicité, la présence d'halogènes, la localisation intracellulaire et les autres applications concomitantes possibles comme l'imagerie médicale.

D'abord, la charge des porphyrines influence leur solubilité dans l'eau et leur localisation intracellulaire. Des porphyrines chargées positivement ont davantage d'affinité avec l'ADN chargé négativement (HIRAKAWA *et al.*, 2007); (ISHIKAWA *et al.*, 2001); (MURASHIMA *et al.*, 2008); (YAMASHITA *et al.*, 2005). On rapporte également des interactions entre les porphyrines cationiques et les mitochondries, les liposomes, les érythrocytes (ENGELMANN *et al.*, 2007); (INADA *et al.*, 2007); (WOODBURN *et al.*, 1992). Pour le présent ouvrage, on a choisi de synthétiser des porphyrines tétracationiques (avec quatre charges positives) en raison de leur meilleure affinité pour les cibles cellulaires comme l'ADN et les mitochondries ainsi que leur bonne solubilité dans l'eau qui en facilite la formulation.

Quant à l'effet de la nature du métal central dans les porphyrines cationiques, les travaux de deux groupes en particulier (JAMES *et al.* ainsi que O'HARA *et al.*), ont inspiré la présente étude. Initialement, les trois métaux prévus à l'essai étaient le cobalt, le zinc et le cuivre, comparés à la porphyrine sans métal. En milieu oxygène (cellules bien oxygénées), le cobaltⁱ et le zinc offriraient une légère radiosensibilisation; en milieu hypoxique (très peu oxygéné), ces métaux amélioreraient la radiosensibilisation dans l'ordre suivant : Co > Zn > Cu ≥ sans métal. Ces tests ont été effectués à des

ⁱ Abandon des essais d'insertion du cobalt, voir la section Discussion.

concentrations de 50 à 100 μM sur des cellules cancéreuses en culture (JAMES *et al.*, 1996); (O'HARA *et al.*, 1989). L'effet du métal central semble controversé, puisque d'autres groupes, comme Kulka *et al.*, rapportent qu'un dérivé de porphyrine sans métal central, le Photofrin II, radiosensibilise des cellules cancéreuses lorsque testé à une concentration de 1 $\mu\text{g/ml}$, ce qui équivaut environ à 1 μM (KULKA *et al.*, 2003). La présente étude visait à comprendre l'impact de la nature du métal central :

- à une concentration de 1 μM , c'est-à-dire une concentration pharmacologiquement réaliste lorsqu'un traitement *in vivo* ou clinique est envisagé éventuellement;
- en milieu oxygène, représentatif des cellules cancéreuses résiduelles (des amas de moins de 300 cellules) après le retrait de la masse cancéreuse principale. Évidemment, le montage expérimental s'avère beaucoup plus simple en milieu oxygène que pour les conditions hypoxiques. Néanmoins, des tests en milieu hypoxiques pourraient faire l'objet d'études ultérieures si l'équipement nécessaire devenait accessible. En effet, les cellules cancéreuses en milieu hypoxique sont plus radiorésistantes et il y a donc aussi un intérêt clinique à développer des radiosensibilisateurs efficaces en milieu hypoxique.

Quant au cuivre, ses radioisotopes disponibles offrent plusieurs autres possibilités de combinaisons de traitement et/ou de diagnostic du cancer : brachythérapie très spécifique et imagerie médicale en tomographie par émission de positrons.

2.4.1. Les effets des atomes d'halogènes sur les radiosensibilisateurs

Jusqu'à présent, la littérature ne rapporte que très peu de données sur des radiosensibilisateurs halogénés. Seuls quelques analogues halogénés de bases azotées ont été étudiés jusqu'à présent comme radiosensibilisateurs (voir Tableau 1). Ces derniers s'incorporent dans l'ADN des cellules et y provoquent différents dommages lors de l'irradiation. Toutefois, ils occasionnent plusieurs problèmes de

toxicité, d'où l'intérêt pour découvrir d'autres molécules halogénées efficaces pour radiosensibiliser les cellules cancéreuses, mais avec moins de toxicité systémique.

Une autre hypothèse postule que les photons de haute énergie peuvent briser le lien carbone – brome et ainsi générer des espèces réactives du brome susceptibles d'endommager des biomolécules vitales pour les cellules cancéreuses. Un tel mécanisme a été observé avec le BrdU qui, lorsqu'irradié, génère des espèces réactives causant des bris simple brin d'ADN et de la réticulation inter brin (CECCHINI *et al.*, 2004); (CECCHINI *et al.*, 2005)

Ces nouvelles connaissances sur l'effet du métal central et de l'addition de bromes selon sa position sur la molécule permettront de contribuer au développement rationnel de radiosensibilisateurs améliorés.

2.5. Thérapie photodynamique

Des cultures très anciennes associaient déjà le soleil et la lumière avec la vie et la médecine. Il y a 34 siècles, le livre indien sacré *Atharva Veda* ainsi qu'un manuscrit bouddhiste décrivaient un phototraitement du vitiligo. Il y a des milliers d'années, on connaissait déjà des effets délétères de l'exposition à la lumière solaire. Ce n'est qu'au 20^e siècle que l'humanité a découvert la nature de la lumière ainsi que des états excités et des radicaux formés lors de l'interaction de la lumière avec certaines molécules. La théorie des ondes électromagnétiques décrit partiellement le phénomène des radiations électromagnétiques, dont la lumière visible (BENSASSON *et al.*, 1993). En effet, cette théorie ne parvient pas à fournir une explication de l'interaction entre la lumière et la matière. Afin de mieux comprendre l'interaction de la lumière avec la matière, il s'avéra nécessaire d'introduire le concept de photons se comportant comme des particules énergétiques (LEWIS, 1926).

La thérapie photodynamique non-invasive dépend d'une absorption de la lumière par le tissu ciblé. Seules des lésions superficielles peuvent être atteintes directement par la lumière ou par des fibres optiques insérées dans les orifices corporels pour acheminer la lumière sur la surface ciblée. La profondeur de pénétrance de la lumière visible se limite à quelques millimètres, par conséquent la thérapie photodynamique se limite à 4-5 mm de profondeur (BABINCOVA *et al.*, 2000). L'eau, ainsi que les chromophores dominants d'un tissu, soit l'hémoglobine et la mélanine, absorbent la lumière. Cette absorbance détermine la profondeur de pénétration de la lumière dans le tissu. Les chromophores endogènes absorbent la lumière de longueurs d'ondes caractéristiques à chacun d'entre eux. L'eau absorbe à des longueurs d'ondes ≥ 1300 nm. L'eau constitue la principale composante des tissus vivants. Par conséquent, un photosensibilisateur idéal possède une absorption maximale à des longueurs d'onde inférieures à 1300 nm. Quant à la mélanine, son maximum d'absorption se situe à 335 nm, dans le spectre ultraviolet UVA (320-400 nm) (KOLLIAS, 1995). Ces rayons UVA traversent la couche d'ozone et peuvent endommager les tissus exposés. Quant aux rayons UVB, seulement partiellement absorbés par la couche d'ozone, ils pénètrent mieux la peau et s'avèrent plus dommageables pour la peau et les yeux. La couche d'ozone absorbe complètement les UVC (200-280 nm), du moins pour le moment. La mélanine sert à protéger l'ADN des rayons ultraviolets néfastes du soleil, en les absorbant. Par conséquent, pour la thérapie photodynamique, on préfère des longueurs d'ondes supérieures à 400 nm pour minimiser l'absorption non-spécifique par la mélanine. Quant à l'hémoglobine, son spectre d'absorption ressemble à celui des porphyrines développées dans la présente étude. L'absorption de l'hémoglobine peut donc interférer un peu avec l'efficacité des photosensibilisateurs. En principe, des photons d'une longueur d'onde allant jusqu'à 1240 nm pourraient être utilisés. Les photons de 1240 nm correspondent à l'écart d'énergie entre l'oxygène à son niveau de base et l'état singulet de l'oxygène. Cependant, il faut atteindre l'écart entre l'état de base et l'état excité du sensibilisateur : des photons d'une longueur excédant 850 nm possèdent une énergie insuffisante pour générer de l'oxygène singulet (JUZENIENE *et al.*, 2007). Bref, le photosensibilisateur idéal doit

absorber entre 400 nm et 850 nm et correspondre à l'intervalle de longueurs d'onde de la lumière administrée.

Le spectre de la lumière visible s'étend entre 400 et 700 nm de longueur d'onde, c'est-à-dire du violet au rouge. L'énergie des photons est inversement proportionnelle à la longueur d'onde. Par exemple, un photon rouge de 700 nm possède 170 kJ/mole, alors qu'un photon violet de 400 nm possède 299 kJ/mole (BENSASSON *et al.*, 1993).

Le Photofrin™ représente la première génération de photosensibilisateurs : des mélanges de polymères hétérogènes dont les principaux pics d'absorption se situent vers 380 nm et entre 600 et 700 nm et qui comportent certaines limitations discutées plus loin. Plusieurs photosensibilisateurs de la seconde génération, des phtalocyanines, absorbent à des longueurs d'ondes supérieures à 630 nm. Cette caractéristique présente l'avantage de minimiser l'interférence d'absorption par l'hémoglobine. En contrepartie, les phtalocyanines s'aggrègent davantage que les monomères de porphyrines, ce qui diminue leur coefficient d'extinction molaire, c'est-à-dire qu'elles absorbent moins intensément la lumière. En effet, ce sont principalement les molécules non agrégées qui génèrent l'oxygène singulet (GOMER *et al.*, 1984); (GRIFFITHS *et al.*, 1994); (MOAN *et al.*, 1984); (MOAN *et al.*, 1992); (STAR, 1995). Dans un monde idéal, la longueur d'onde optimale devrait fournir un rendement maximal de génération d'oxygène singulet et pénétrer à la profondeur maximale (JUZENIENE *et al.*, 2007).

Les considérations énumérées ci-haut justifient le choix d'utiliser tout le spectre visible (entre 400 et 700 nm) pour effectuer les tests de photosensibilisation avec des porphyrines dont le maximum d'absorption se situe entre 400 et 460 nm, avec d'autres pics d'absorption secondaires décalés vers le rouge. Dans le présent travail, l'absence d'émission de rayons ultraviolets, capables de tuer les cellules en

endommageant l'ADN, a été vérifiée à l'aide de sondes appropriées sur les sources lumineuses utilisées pour les expériences décrites dans l'article.

L'absorption de lumière génère de la chaleur. En général, un débit d'illumination de 150 mW/cm² causera de l'hyperthermie. De surcroît, un débit d'illumination élevé déplete rapidement l'oxygène (BABILAS *et al.*, 2003); (BUSCH *et al.*, 2002); (HENDERSON *et al.*, 2000); (HENDERSON *et al.*, 2006); (MICHAÏLOV *et al.*, 1997); (SITNIK *et al.*, 1998); (SVAASAND, 1985); (WANG *et al.*, 2004). Lorsque l'oxygène se raréfie dans le milieu environnant des cellules cancéreuses, la génération d'oxygène singulet diminue et par conséquent, la thérapie photodynamique perd de son efficacité. Par conséquent, un faible débit d'illumination, soit 25 J/cm², a été utilisé pour illuminer les cellules dans le présent ouvrage.

Les dérivés de porphyrines possèdent des pics d'absorption maximale entre 400 et 850 nm et sont d'excellents générateurs d'oxygène singulet. C'est pourquoi leurs dérivés sont étudiés pour leur potentiel photosensibilisateur.

La thérapie photodynamique est maintenant utilisée en clinique comme traitement pour la dégénérescence maculaire et la myopie pathologique. Elle est même étudiée en traitement expérimental pour la maladie coronaire artérielle, le syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA), des maladies autoimmunes, les rejets de greffes et la leucémie. L'accessibilité de la peau permet aux dermatologues d'utiliser la thérapie photodynamique pour traiter certains problèmes cutanés tels les kératoses actiniques, des carcinomes des cellules basales et la maladie de Bowen (LANE, 2003). N'importe quel tissu cancéreux accessible directement avec un laser ou une autre source de lumière adéquate insérée dans un orifice corporel naturel peut être traité en thérapie photodynamique. Par exemple, la thérapie photodynamique traite un large éventail de cancers gastrointestinaux en clinique à l'aide d'une source de lumière endoscopique (WANG *et al.*, 2007).

En clinique, des porphyrines ont été approuvées pour utilisation en tant que photosensibilisateurs en thérapie photodynamique : Photofrin™ et Photosan™ (deux polymères de porphyrines). Bien qu'aucun radiosensibilisateur n'ait été approuvé en clinique jusqu'à présent, des études préliminaires démontrent que des dérivés de porphyrines ont un fort potentiel (KULKA *et al.*, 2003); (LUKSIENE, 2004); (LUKSIENE *et al.*, 2006); (MILLER *et al.*, 1999); (O'HARA *et al.*, 1989); (SCHAFFER *et al.*, 2003); (SCHAFFER *et al.*, 2006); (SESSLER *et al.*, 2000); (VIALA *et al.*, 1999); (VICENTE, 2001); (YOUNG *et al.*, 1996a). Les dérivés de porphyrines peuvent aussi servir d'agents de fluorescence ou de radiotraceurs. Il existe même des dérivés de porphyrines en développement dans le but de combiner à la fois un agent de fluorescence et un radiotraceur pour l'imagerie et en plus un photosensibilisateur pour le traitement du cancer (PANDEY *et al.*, 2005).

2.5.1. Mécanisme d'action de la thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique est une approche innovatrice en oncologie : au lieu d'utiliser des agents directement cytotoxiques, elle utilise une molécule spécifique aux cellules cancéreuses qui les tue indirectement seulement lorsqu'activée par la lumière. « Si une porphyrine est injectée dans un tissu malade, tel une tumeur cancéreuse, elle peut être activée par la lumière pour détruire ce tissu. » (Lane, 2003)

Lorsque des porphyrines non-métallées sont excitées en absorbant de la lumière d'une certaine longueur d'onde, leurs électrons sont excités vers des orbitales d'énergie plus élevées que le niveau basal. Ces porphyrines excitées peuvent alors transmettre leur énergie à d'autres molécules avoisinantes comme l'oxygène moléculaire. Le réactif oxygène singulet est ainsi généré. L'oxygène singulet est très réactif et il peut aussi produire d'autres espèces réactives : ce sont des radicaux libres (ROS) (LANE, 2003). Sur la figure qui suit, la flèche en gras indique qu'il s'agit de la voie principale de transfert d'énergie.

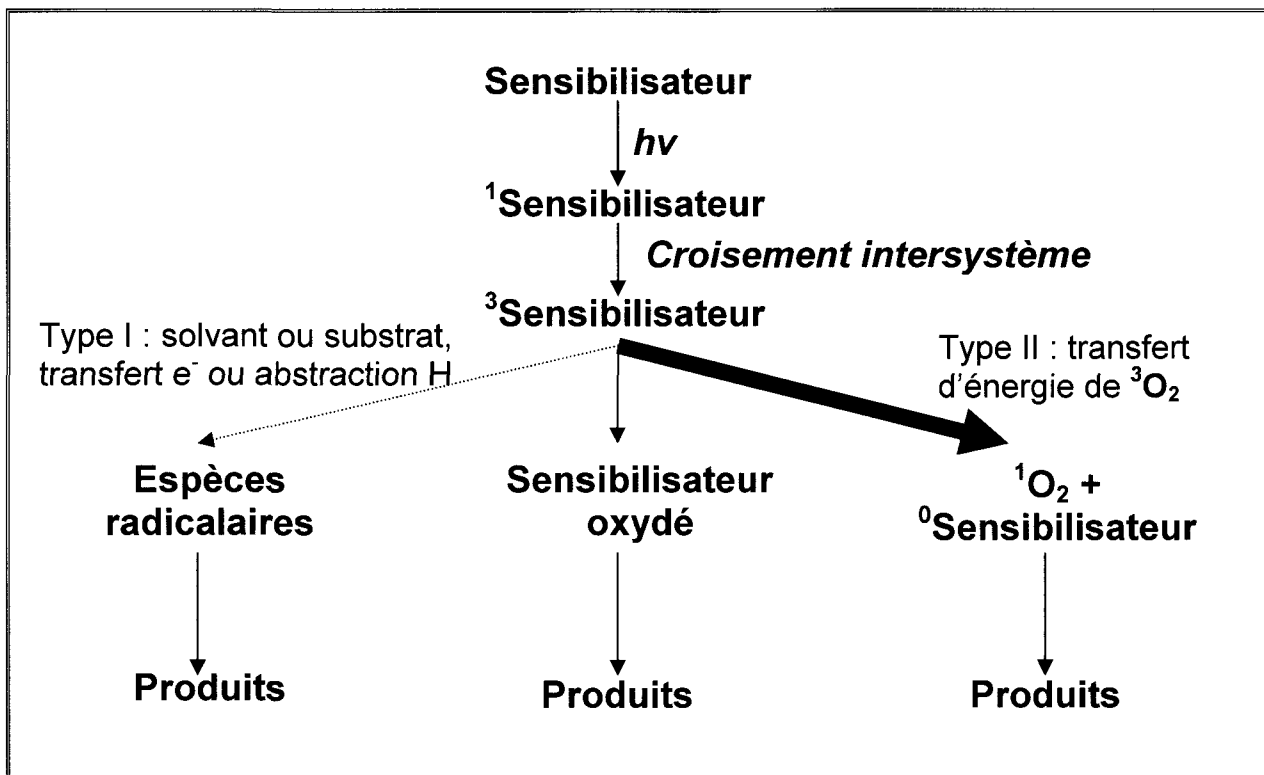


Figure 5 : Mécanisme de la génération d'espèces réactives en thérapie photodynamique (SELKE, 2007)

Remarque : Le chiffre en exposant à gauche exprime l'état quantique de la molécule. 1 = singulet, 3 = triplet et 0 = état d'énergie minimale. Par exemple, 1O_2 signifie oxygène singulet et 3 Sensibilisateur signifie l'état triplet du sensibilisateur. Généralement, l'état triplet est un état d'énergie supérieure, donc plus réactif que l'état singulet. L'oxygène fait exception: son état singulet est plus réactif que son état triplet. L'oxygène moléculaire dans l'air respirable se trouve généralement à son état triplet.

2.5.2. Les photosensibilisateurs non-dérivés de porphyrines

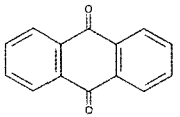
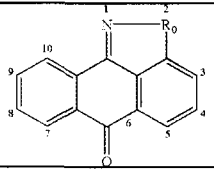
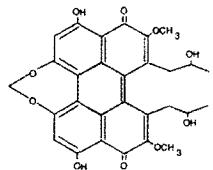
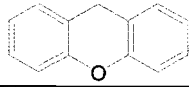
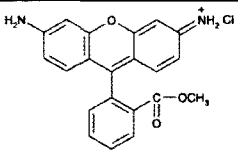
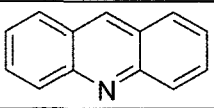
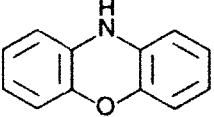
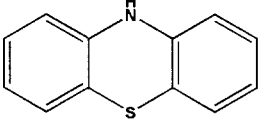
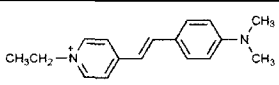
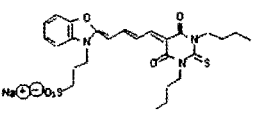
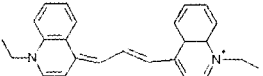
Bien que la recherche de photosensibilisateurs se concentre principalement sur les dérivés de porphyrines, il existe aussi d'autres types de composés chimiques au potentiel photosensibilisant. Le tableau suivant présente les principaux photosensibilisateurs qui ont été à l'étude jusqu'à présent (DIWU *et al.*, 1994).

En observant les structures chimiques des photosensibilisateurs ci-dessous, on remarque qu'ils sont tous des composés aromatiques dans lesquels il y a beaucoup d'électrons délocalisés. Quelques-uns d'entre

eux sont chargés : ils ont des charges positives. Les porphyrines à l'étude dans le présent ouvrage présentent ces mêmes caractéristiques : aromatiques et cationiques.

Enfin, l'acide 5-amino-lévilinique (ALA), un précurseur de la synthèse de porphyrines endogènes, peut augmenter la production de protoporphyrine IX lorsqu'administré en excès. L'acide aminolévilinique n'est ni aromatique ni photosensibilisateur seul : c'est la protoporphyrine IX qui s'avère la véritable molécule aromatique active. Administré oralement ou par voie intraveineuse, l'acide aminolévilinique cause de la photosensibilité; appliqué topiquement, il présente l'avantage d'éviter la photosensibilité systémique, en limitant la surproduction de protoporphyrine IX à la zone d'application. Sa toxicité est faible, car l'organisme élimine rapidement la protoporphyrine IX en 24 à 48 heures. En raison de sa grande hydrophilicité, l'acide aminolévilinique pénètre peu les membranes cellulaires hydrophobes. Plusieurs dérivés estérifiés de l'acide aminolévilinique, dont Hervix™, ont été synthétisés et éprouvés en clinique pour contourner ce problème qu'est la photosensibilité systémique (JUZENIENE *et al.*, 2007).

Tableau 2 : Principaux photosensibilisateurs non dérivés de porphyrines
(DAUB *et al.*, 2005) (ARA *et al.*, 1987)

COMPOSÉ	STRUCTURE CHIMIQUE	PARTICULARITÉS
Anthraquinones		Synthétisée chimiquement Utilisée aussi comme laxatif
Anthrapyrazoles		
Perylènequinones		Toxine d'un microchampignon envahisseur de plantes : la cercosporine
Xanthènes		Synthétisée chimiquement Utilisée aussi comme fongicide
Rhodamine 123		Sélectivité supérieure pour les tumeurs Lie la membrane mitochondriale et inhibe la respiration cellulaire
Acridines		S'intercalent dans l'ADN et l'ARN
Phenoxazines		
Phenothiazines		Plusieurs dérivés sont des drogues avec des effets pharmacologiques sur le système nerveux : sédatifs, antipsychotiques, antiémétiques et autres. Ils ont bien sûr plusieurs effets secondaires. Initialement utilisé comme insecticide et anthelminthique (contre les vers).
Cyanines		Utilisés pour le marquage de nucléotides et des résidus cystéines de protéines pour les études en fluorescence
Merocyanine 540		Sélectivité supérieure pour les tumeurs
Dérivés cyanines cationiques		Sélectivité supérieure pour les tumeurs Cible cellulaire : les mitochondries

2.5.3. Les photosensibilisateurs dérivés des porphyrines

Les dérivés de porphyrines photosensibilisateurs de la première génération comportent plusieurs défauts, dont la contamination par des impuretés et une photosensibilité prolongée de la peau durant 6 à 8 semaines (MOSER, 1998); (DOUGHERTY *et al.*, 1998); (WÖHRLE *et al.*, 1998). Néanmoins, pendant longtemps, le seul approuvé en clinique a été le Photofrin™ (HpD, Photofrin, Axcan Pharma) et depuis 1993 on l'utilise encore couramment pour de nombreuses indications, dont les cancers gastriques, endobronchiaux, pulmonaire, cervical, de la vessie et de l'œsophage (JUZENIENE *et al.*, 2007).

Les photosensibilisateurs de la deuxième génération comptent des monomères : les phtalocyanines, les naphthalocyanines, les benzoporphyrines, les chlorines, les purpurines, les texaphyrines, les porphycènes, les pheophorbides, les bactériochlorines et bien d'autres. Ces photosensibilisateurs contournent les problèmes rencontrés avec ceux de la première génération (MOSER, 1998); (ALLISON *et al.*, 2004); (BONNETT, 1995); (CASTANO *et al.*, 2004); (DETTY *et al.*, 2004); (PUSHPAN *et al.*, 2002) : une substance chimiquement pure peut être obtenue, la photosensibilité non-spécifique de la peau a une durée moindre, ils génèrent efficacement l'oxygène singulet et ils absorbent intensément entre 650 et 850 nm. Deux sensibilisateurs de cette génération ont été approuvés en clinique, soit le *mé*ta-tétra hydroxyphényle chlorine (m-THPC; Foscan, Biolitec AG) et le dérivé benzoporphyrine monoacide A (BPD-MA; Visudyne™, QLT Inc. et Novartis Ophthalmics). En ce moment se déroulent d'autres études cliniques pour évaluer le potentiel de plusieurs autres photosensibilisateurs de deuxième génération: le BOPP (porphyrine portant un atome de bore; Pacific Pharmaceuticals Inc.), le Npe6 (mono-*N*-aspartyl chlorine e6, talaporfine; Meiji Seika Kaisha Ltd), l'hypéricine (Pharmaceuticals Inc.), l'AIPcS_n (phtalocyanine sulfonée portant un atome d'aluminium, Photosense™; State Research Center), le dérivé de chlorine e6 (Photodithazine; State Research Center), l'ATMPn (porphycène; Glaxo-

Wellcome Inc.ⁱⁱ), l'HPPH (2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyle pyropheophorbide-a, Photochlor™; Roswell Park Cancer Institute), le motexafin lutétium (MLu, lutetium(III) texaphyrine, Lu-Tex, Antrin; Pharmacyclics Inc.), le SnET2 (éthyle étiopurpurine avec un atome d'étain, Sn étiopurpurine, rostaporfine, Photrex™; Miravant Medical Technologies) (CALZAVARA-PINTON *et al.*, 2007); (HUANG, 2005); (MOAN *et al.*, 2003).

Quant à la troisième génération de photosensibilisateurs, elle consiste en des photosensibilisateurs de deuxième génération liés à des transporteurs visant une accumulation encore plus sélective dans les tumeurs (MOSER, 1998); (WÖHRLE *et al.*, 1998). Parmi ces derniers, il y a des photosensibilisateurs conjugués à des biomolécules telles des anticorps monoclonaux, des liposomes et autres (MOSER, 1998); (DERYCKE *et al.*, 2002); (WÖHRLE *et al.*, 1998). D'intenses efforts de recherche sont consacrés à mieux comprendre et optimiser la structure chimique des dérivés de porphyrines pour améliorer leurs propriétés photosensibilisantes.

2.5.4. L'ajout d'halogènes sur des photosensibilisateurs et leur effet sur leurs propriétés photosensibilisantes

L'ajout d'atomes de brome à la structure des photosensibilisateurs dérivés de la rhodamine augmente la durée de leur état excité: l'addition de brome augmente la formation d'oxygène singulet et par conséquent, augmente l'effet thérapeutique de la rhodamine (LACERDA *et al.*, 2005); (PAL *et al.*, 1996). Les atomes de brome, de fluor, de chlore et d'iode font tous partie de la famille des halogènes: leur caractère électrophile en fait de bons groupes partants. L'halogénéation des porphyrines modifie leur nuage électronique en fonction de la position des halogènes sur la molécule. L'halogénéation influence la génération de l'état quantique de triplet, c'est-à-dire que l'halogénéation augmente la probabilité qu'une porphyrine excitée génère l'oxygène singulet. Yang *et al.* ont démontré et expliqué avec élégance les

ⁱⁱ Maintenant Glaxo-SmithKline depuis la fusion, après que l'article cité ait été écrit

effets de l'halogénéation avec le fluor et le chlore sur l'état triplet de dérivés de porphyrines (YANG *et al.*, 1999). Ko *et al.* suggèrent que la position des atomes de fluor et la position des cations sur la molécule influencent ses propriétés photosensibilisantes (KO *et al.*, 2007). Un changement dans les propriétés photosensibilisantes a également été observé avec l'addition d'atomes de chlore sur des porphyrines (DABROWSKI *et al.*, 2007).

La théorie de l'effet des atomes lourds stipule que l'échange d'atomes d'hydrogènes avec des atomes plus lourds (comme le brome) sur un chromophoreⁱⁱⁱ augmente le croisement intersystème. Autrement dit, l'effet des atomes lourds augmente la transition de l'état singulet vers l'état triplet en augmentant le couplage spin-orbitale, permettant ainsi des changements de spin autrement interdits ($S_1 \rightarrow T_1$) (WAINWRIGHT, 1996).

Or, pour une série de dérivés de phtalocyanines^{iv} tétrahalogénés avec un zinc en leur centre, il a été observé que l'augmentation de la formation de l'état triplet et la diminution de la durée de l'état triplet augmentaient dans l'ordre suivant: Cl < Br < I, tel que prédit par la théorie du couplage spin-orbitale. Cependant, l'agrégation des phtalocyanines halogénées contrebalançait ces bienfaits (ZHANG *et al.*, 1993). En effet, les molécules sont de médiocres photosensibilisateurs lorsqu'agrégées; les photosensibilisateurs monomérisés (non agrégés) génèrent davantage d'oxygène singulet et sont par conséquent de meilleurs photosensibilisateurs. Les porphyrines cationiques de la présente étude devraient se monomériser mieux que les phtalocyanines, alors l'effet des atomes lourds devrait en théorie se manifester davantage.

ⁱⁱⁱ Un chromophore est un groupement chimique qui absorbe sélectivement la lumière de certaines longueurs d'onde, donnant ainsi une couleur à certains composés organiques, tels les porphyrines.

^{iv} Les phtalocyanines sont des « cousines » proches des porphyrines. Les phtalocyanines sont des dérivées des porphyrines, caractérisées par un anneau benzène juxtaposé sur chacun des 4 cycles pyrrole d'une porphyrine de base. Les phtalocyanines sont donc plus hydrophobes que les porphyrines en général.

2.6. Spécificité des porphyrines envers les cellules cancéreuses et leur localisation intracellulaire

Les porphyrines s'accumulent en général davantage dans les cellules cancéreuses que dans les cellules musculaires normales. D'ailleurs, plusieurs radiopharmaceutiques et agents de contraste pour l'imagerie du cancer sont en développement à partir de porphyrines. Cette accumulation spécifique dans les cellules cancéreuses motive le choix de molécules dérivées de porphyrines comme radio et photosensibilisateurs afin de minimiser les dommages au tissu sain. Tel que mentionné dans la section 1.3, la localisation intracellulaire spécifique des porphyrines en détermine le mécanisme de mort cellulaire (HSIEH *et al.*, 2003). Dans le présent ouvrage, nous avons donc utilisé la microscopie confocale à fluorescence pour observer la localisation intracellulaire des porphyrines à l'étude. Il est donc pertinent de se poser la question : « Comment et où les porphyrines s'accumulent-elles dans les cellules cancéreuses? »

Pendant longtemps un dogme a été entretenu selon lequel l'hème et autres porphyrines diffuseraient à travers les membranes plasmiques des cellules. Cependant, la nature lipophile des porphyrines favorise davantage leur accumulation dans la double membrane lipidique plutôt que leur transport d'un côté à l'autre de la membrane. Krishnamurthy *et al.* suggèrent que cette propriété des porphyrines de s'accumuler dans les membranes contribue en partie aux dommages infligés à la membrane plasmique et à celles des organelles intracellulaires lors de la thérapie photodynamique (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2007). Bien que les dommages à la membrane plasmique puissent contribuer à la photosensibilisation, l'accumulation de porphyrines dans des organelles intracellulaires ou dans le noyau peuvent aussi contribuer significativement à l'effet photosensibilisateur.

D'autres auteurs, comme Silva *et al.*, suggèrent que des porphyrines entrent dans les cellules par endocytose (SILVA *et al.*, 2008). L'hypothèse de l'endocytose des porphyrines médiée par un récepteur

est apparue dans la littérature en 1979, suite à la découverte d'une protéine liant l'hème avec une grande affinité et située dans le duodénum chez le porc et l'humain (GRASBECK *et al.*, 1979). En 1985, Galbraith *et al.* ont trouvé et décrit une protéine très similaire liant l'hème à la surface de cellules d'érythroleucémie chez la souris (GALBRAITH *et al.*, 1985). Quelques auteurs ont observé par microscopie électronique la formation de vésicules transportant l'hème de la membrane cellulaire à l'intérieur de la cellule dans des lysosomes secondaires. Néanmoins, cette hypothèse de l'endocytose demeure controversée et des transporteurs de l'hème ont été découverts récemment (WEST *et al.*, 2008).

Plusieurs transporteurs de porphyrines ont été identifiés (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2007), notamment HCP1 (Heme Carrier Protein 1). HCP1 est exprimé à la surface apicale du duodénum pour absorber des métalloporphyrines de source alimentaire. L'hypoxie induit fortement la transcription de l'ARNm de HCP1, ce qui augmente l'expression de HCP1 pour importer davantage de métalloporphyrines. (SHAYEGHI *et al.*, 2005) Chez un humain atteint du cancer, il est fréquent que des cellules cancéreuses se retrouvent en hypoxie. L'expression d'HCP1 a effectivement été confirmée à la surface de cellules cancéreuses, soit la lignée d'hépatome Hepa et la lignée de neuroblastome NB41A (SHAYEGHI *et al.*, 2005).

Plusieurs expériences suggèrent qu'un transport actif est nécessaire pour acheminer les porphyrines dans les mitochondries afin d'assurer la biosynthèse de l'hème (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2007). La protéine Abcb6 est associée à la membrane externe des mitochondries et régule la biosynthèse des porphyrines dans la mitochondrie. En s'appuyant sur leurs résultats publiés en 2006, Krishnamurthy *et al.* suggèrent qu'Abcb6 soit impliquée dans l'importation des porphyrines dans la mitochondrie et ils spéculent qu'Abcb6 jouerait un rôle dans la prolifération cellulaire. La protéine Abcb6 est fortement exprimée dans les cellules dont l'activité métabolique est très élevée (KRISHNAMURTHY *et al.*, 2007);

(KRISHNAMURTHY *et al.*, 2006). L'expression d'Abcb6 a été détectée dans une lignée cellulaire de carcinome mammaire (PARK *et al.*, 2006) et pourrait expliquer une accumulation de porphyrines dans les mitochondries de cellules cancéreuses, tel qu'observé pour d'autres dérivés de porphyrines.

3. Objectifs

La présente étude a pour but d'évaluer *in vitro* l'effet de la présence et de la position des bromes sur les propriétés radio- et photosensibilisantes de porphyrines cationiques chez les cellules MDA-MB-231, une lignée cellulaire de carcinome mammaire chez l'humain. En plus, les impacts de la présence et de la nature du métal central sur leurs propriétés radio- et photosensibilisantes seront déterminés. Une meilleure compréhension de l'influence de ces paramètres permettra de guider et d'optimiser le développement rationnel de structures chimiques de porphyrines pour mettre au point des radio- et photosensibilisateurs améliorés.

Article scientifique

4. Article scientifique

4.1. Avant-propos : contribution de l'auteure à l'article scientifique

Bromines on *N*-allyl position of cationic porphyrins affect both radio/photosensitizing properties

Picard, N., Ali, H., van Lier, J.E., Klarskov, K. et Paquette, B.
Soumis à la revue *Photochemical & Photobiological Sciences* (Juillet 2008)
Re-soumis après corrections (Novembre 2008)

Contribution: J'ai effectué toutes les synthèses, toutes les manipulations et toutes les analyses pour toutes les figures, à l'exception des spectres de masse et les mesures d'incorporation cellulaire (cell uptake) et de génération d'oxygène singulet. J'ai préparé les échantillons pour la spectrométrie de masse qui a été effectuée par l'équipe de Klaus Klarskov Ph. D. J'ai analysé les résultats de la spectrométrie de masse avec l'aide et les conseils des co-auteurs. J'ai rédigé la première version du manuscrit de l'article.

AUTORISATION D'INTÉGRATION
D'UN ARTICLE ÉCRIT EN COLLABORATION
À UN MÉMOIRE OU UNE THÈSE

Je (ou nous), soussignée(s), soussigné(s), co-auteure(s), co-auteur(s) de l'article intitulé :

Bromines on *N*-allyl position of cationic porphyrins affect both radio/photosensitizing properties

reconnais (reconnaissons) que ledit article sera inclus comme partie constituante du mémoire de la thèse

de l'étudiant(e) (nom) : Nathalie Picard

inscrit(e) au programme de Radiobiologie

de la Faculté de Médecine et sciences de la santé de l'Université de Sherbrooke

En foi de quoi, j'ai (nous avons) signé cet engagement en un nombre suffisant d'exemplaires*

Signature _____ Date : _____

Nom Hasrat Ali Ph.D. Hasrat.Ali@USherbrooke.ca

Coordonnées Dép. Médecine nucléaire et radiobiologie, Université de Sherbrooke
3001, 12e avenue Nord, Méd-6435, Fleurimont, J1H 5N4 819-820-6868 # 15807

Signature _____ Date : _____

Nom Johan E. van Lier Ph.D. Johannes.Van.Lier@USherbrooke.ca

Coordonnées Dép. Médecine nucléaire et radiobiologie, Université de Sherbrooke
3001, 12e avenue Nord, Méd-6428, Fleurimont, J1H 5N4 819-820-6868 # 14603

Signature _____ Date : _____

Nom Klaus Klarskov Ph.D. Klaus.Klarskov@USherbrooke.ca

Coordonnées Dép. Pharmacologie, Université de Sherbrooke
3001, 12e avenue Nord, Z5-2051, Fleurimont, J1H 5N4 819-820-6868 # 15490

Signature _____ Date : _____

Nom Benoit Paquette Ph.D. Benoit.Paquette@USherbrooke.ca

Coordonnées Dép. Médecine nucléaire et radiobiologie, Université de Sherbrooke
3001, 12e avenue Nord, Méd-6449, Fleurimont, J1H 5N4 819-820-6868 # 14767

* Un exemplaire pour l'étudiante, l'étudiant, un exemplaire pour chaque personne signataire et un exemplaire pour le Service des bibliothèques (à remettre avec le mémoire ou la thèse au moment du dépôt final).

Bromines on *N*-allyl position of cationic porphyrins affect both radio/photosensitizing properties

Nathalie Picard, Hasrat Ali, Nicole Cauchon, Johan E. van Lier, Klaus Klarskov and Benoit Paquette

With the aim to develop improved dual-action sensitizers suitable for both photodynamic therapy (PDT) and radiotherapy, we prepared a series of metal and metal-free cationic porphyrins, brominated either on β - or *N*-allyl positions. Photo- and radiosensitizing efficacy was evaluated in MDA-MB-231 breast cancer cells incubated with 1 μ M porphyrin and treated with graded doses of visible light or 0-6 Gy of ^{60}Co gamma irradiation. Metabolic activity after PDT or cell survival after gamma irradiation were estimated by a colorimetric (MTT) or clonogenicity assay, respectively. The highest photo- and radiosensitizing activities were observed with the porphyrins substituted with bromines on *N*-allyl positions. The non-metalated *N*-allyl bromoporphyrin exhibited the highest photocytotoxicity ($\text{LD}_{50} = 4.1 \pm 0.6 \text{ J/cm}^2$, compared to $15.3 \pm 2.2 \text{ J/cm}^2$ for the non-brominated analog). The radiosensitizing capacity of the cationic porphyrins was also affected by these substitutions with the non-metalated *N*-allyl bromo analog showing the best improvement ($\text{LD}_{50} = 1.2 \pm 0.4 \text{ Gy}$ vs. $3.6 \pm 0.9 \text{ Gy}$ for the non-brominated analog). The increased photodynamic and radiosensitizing potencies due to bromine addition hold potential for the development of new, improved drugs for cancer treatment in combination with photodynamic and radiation therapy.

Introduction

Treatment protocols of malignant tumors generally involve surgery, radiotherapy, chemotherapy, or a combination of these treatment modalities. More recently, photodynamic therapy (PDT) provides an alternative approach for the treatment of light-accessible cancers. Radiotherapy and photodynamic therapy treat well-localized tumors and provoke fewer side effects as compared to systemic treatments such as chemotherapy. Whereas ionizing radiation has a direct effect on living tissue, photodynamic therapy requires prior administration of a photosensitizer to convert the visible light to cytotoxic species which induce tumor regression. Radiosensitizers generate secondary toxic species that can enhance the efficacy of radiotherapy.

PDT is a cancer treatment modality that uses visible light, a photosensitizer and molecular oxygen to generate reactive oxygen species (ROS), mainly singlet oxygen, that interact with vital cellular components inducing a cytotoxic effect¹. Porphyrins are among the most studied photosensitizers due to their biocompatibility and excellent capacity to generate singlet oxygen. A mixture of hematoporphyrin derivatives (PhotofrinTM) is in worldwide use for PDT of advanced cancers accessible to visible light. However, PhotofrinTM has several well-recognized limitations as a photosensitizer for PDT including chemical heterogeneity, poor pharmacokinetics and prolonged cutaneous photosensitivity. These drawbacks led to an intensive search for new, chemically well-defined, improved sensitizers for PDT including the advancement of novel porphyrins and phthalocyanines². Among these, the cationic porphyrins arouse interest due to their good water-solubility, selectivity for tumor cells³, interaction with DNA and potential inhibition of telomerases⁴⁻⁶ along with interactions with other vital cell targets such as mitochondria^{7,8}.

Certain porphyrins that localize in tumors have also been explored as potential radiosensitizers⁹⁻¹². Several classes of metal complexes are proposed as radiosensitizers, including

selected chemotherapeutic agents such as platinum drugs^{13, 14}. A central metal ion chelated into porphyrins improves their radiosensitizing properties under both oxic and hypoxic conditions, i.e. Zn >> Cu ≥ no metal^{15, 16}. However, conflicting reports on the radiosensitizing activities of metalloporphyrins have appeared, arguing that PhotofrinTM, without metal ion, radiosensitizes better than Zn metalloporphyrins derivatives¹⁷. PhotofrinTM, a non-metalated porphyrin derivative which is in clinical use for PDT of various cancers, was also studied extensively for its radiosensitizing properties^{10, 11, 18-20}. Nevertheless, a clear understanding of structural features that could explain its activity remains obscure. Gadolinium-Texaphyrin (Gd-Tex) is an example of a porphyrin-based drug that has been advanced to clinical trials as a potential radiosensitizer²¹⁻²³. Currently, no approved radiosensitizer is available for clinical use.

The radiosensitizing effect of atoms like bromine, gadolinium, iodine and platinum may involve a resonant or a non-resonant mechanism. The resonant mechanism implies ejection of a K-shell electron, which is subsequently filled with a higher orbital electron and ultimately yields a cascade of either characteristic x-rays or Auger electrons^{24, 25}. In the case of bromine, the energy of a K-shell electron is 13.4 keV^{26, 27} and exposure to ⁶⁰Co radiation (two gamma rays of 1,17 and 1,33 MeV) favors a non-resonant mechanism (i.e. energy of the incident radiation is not similar to the binding energy of the electrons ejected from the molecule irradiated) to inflict biological damage. Incorporating bromodeoxyuridine (BrdU) into DNA

increases the sensitivity of the DNA to radiation, resulting in single and double strand breaks. This confirms that the addition of bromine to uridine increases the formation of free radicals and other reactive species produced by ionizing radiation²⁸⁻³⁰. In the case of porphyrins, substitution of hydrogen atoms by halogens modifies electron distribution, influencing the triplet state quantum yield and singlet oxygen production, thus improving their photodynamic potency³¹. For example, substituting tetrapyrridyl cationic porphyrins with fluorine at variable positions on the pyridinium ring increases its phototoxicity³² while addition of bromine to rhodamine likewise enhances its photodynamic efficacy³³. We recently reported the potential effect of bromine addition onto cationic porphyrins on the radiosensitizing potency of the parent molecule³⁴. In a continuation of this work, we present here a detailed account of the synthesis and characterization of a series of brominated cationic porphyrins, their cell uptake, capacity to generate singlet oxygen, photo- and radiosensitizing properties and an evaluation of potential structure-activity relationships.

Materials and methods

All solvents and reagents were high-quality grade and used without further purification. The purity and homogeneity of porphyrin products were established by analytical HPLC (Shimadzu) on a C18 PRP-1 reversed-phase column (Hamilton) (4.6 × 250 mm, 5 μm). A linear gradient of 10% CH₃CN and 90% buffer (12 mM TFA and 37 mM TEA, pH at 2.5) up to 100% CH₃CN at 2 mL/min over 30 min was used. Eluting porphyrins were detected at λ = 420 or 450 nm. ESI-MS/MS was carried out using a Q-tof-2 instrument and MALDI-TOF on a ToF Spec 2E

instrument, both from Micromass. For MS analysis, samples were dissolved in either 50% CH₃CN/H₂O or CH₃OH/H₂O. MALDI-TOF was performed using dithranol matrix or without matrix. UV-vis spectra were recorded using Hitachi U-2000 spectrophotometer. Fluorescence was detected with a Hitachi F-2000 spectrofluorometer. The starting material 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrin for the synthesis of all modified porphyrins, was obtained from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO). Flash chromatography was performed on Septra SDB-L (255 Å, Phenomenex).

Porphyrin synthesis

5,10,15,20-tetra(4-pyridyl(*N*-prop-2'-ene)) 21*H*,23*H*-porphine (2)

5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl)-21*H*,23*H*-porphine (1) (100 μmol) and 3-bromopropene (10X molar excess) in *N,N*-dimethylformamide (DMF) (20 mL) was heated at 60°C for 16 h in the dark and the color of the reaction mixture turned from purple to red. After cooling at room temperature, diethyl ether (100 mL) was added and the precipitated porphyrin was collected by filtration under vacuum on a 0.22 μm nylon membrane. The resulting powder was air-dried and stored at 4°C, shielded from light. Yield: 95%; MS HRMS ESI⁺: calcd. for C₅₂H₄₆N₈ 782.3845: Found *m/z* 195.5961 [M⁴⁺, 40%], 260.46 ([M-H]³⁺, 100%), 247.11 ([M-C₃H₆]³⁺, 60%) 350.16 ([M-(C₃H₆)₂]²⁺, 35%) UV-vis, λ_{max} (emulsion 5 μM) (log □): 424 nm (5.20), 369 nm (4.37), 519 nm (4.04), 555 nm (3.70), 585 nm (3.70), 642 nm (3.14); fluorescence (emulsion 5 μM), λ_{ex}: 424 nm, λ_{em}: 659, 686, 715 nm.

5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl-*N*-2',3'-dibromoprop-2'-ene)21*H*,23*H*-porphine (3)

The same method was used as for the preparation of 2, except that the 3-bromopropene was replaced with 1,2,3-tribromopropene. On eluting with CH₃OH/H₂O (3:70) the final product 3 was obtained. Yield >80 %; MS HRMS ESI⁺ calcd. for C₅₂H₃₈N₈Br₈ 1405.668: Found 470.85; ([M-C₃H₃Br₂]³⁺ 15%) 404.90; ([M-(C₃H₃Br₂)₂]²⁺ 5%), 507.92; ([M-C₃H₃Br₂]²⁺ 100%); 606.86; (M-[C₃H₃Br₂]¹⁺ 20%), 198.85 (8%). MS MALDI-TOF: calcd. 1414.1415; Found 1419.8168 (M⁺); 1221.2662 [M-C₃H₃Br₂]; 1019.7605 [M-(C₃H₃Br₂)₂]; 815 [M-(C₃H₃Br₂)₃]; 618 [M-(C₃H₃Br₂)₄]; UV-vis, λ_{max} (emulsion 5 μM) (log □): 417 nm (5.28), 369 nm (4.41), 513 nm (4.12), 547 nm (3.74), 587 nm (3.70), 643 nm (3.30); fluorescence (emulsion 5 μM), λ_{ex}: 430 nm, λ_{em}: 652 and 716 nm.

5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl-*N*-propane)21*H*,23*H*-porphine (8)

The same method was used as described above for 3, except that the 3-bromopropene was replaced with 1-bromopropane. Yield 93%; UV-vis, λ_{max} (methanol) (log □): 425 nm (4.93), 516 nm (3.86), 551 nm (3.47), 591 nm (3.43), 646 nm (2.86).

General procedure for metal insertion

Metal free porphyrin (2, 3 and 8) (30 μmol) and excess of metal salt Cu(OAc)₂·H₂O (100 μmol) or Zn(OAc)₂·H₂O (100 μmol) were mixed in methanol (15 mL) and stirred in the dark at room temperature for 2 h. Diethyl ether (50 mL) was added and the precipitated porphyrin was

collected by filtration. Flash chromatography over Septra SDB-L (255 Å; Phenomenex) in CH₃OH/H₂O (1:1) was used for purification to remove excess of the metal salt.

5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl-*N*-prop-2'-ene) porphyrinato Cu(II) (4)

Yield: ≥ 95%; MS HRMS ESI⁺ calcd. for C₅₂H₄₄N₈Cu: 843.2984.: Found ESI⁺ m/z 210.81 (M⁴⁺, 100%); 281.42 (M³⁺, 20%); 380.57 [(M-2xC₃H₅)²⁺, 90%]. UV-vis, λ_{max} (emulsion 5 μM) (log □): 428 nm (5.15), 319 nm (4.20), 549 nm (4.12).

5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl-*N*-prop-2'-ene) porphyrinato Zn(II) (5)

Yield: ≥ 95%; MS HRMS ESI⁺ calcd. for C₅₂H₄₆N₈Zn 844.30. Found 282.2 (M³⁺, 80%); 381.116 (M²⁺, [M-2xC₃H₅]⁺, 10%). UV-vis, λ_{max} (emulsion 5 μM) (log □): 439 nm (5.16), 324 nm (4.27), 369 nm (4.24) 565 nm (4.12); 606 nm (3.68); fluorescence (emulsion 5 μM), λ_{ex}: 441 nm, λ_{em}: 634 nm (and a shoulder at 678 nm).

5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl-*N*-2',3'-dibromoprop-2'-ene) porphyrinato Cu(II) (6)

Yield: ≥ 95%; MS HRMS ESI⁺ calcd. for C₅₂H₃₆Br₈N₈Cu: 1466.58. Found ESI⁺ 880.118[M⁺ - 3xC₃H₃Br₂, 30%,], 539.499 ([M²⁺ -2xC₃H₃Br₂], 100%). UV-vis, λ_{max} (emulsion 5 μM) (log □): 414 nm (5.29), 538 nm (4.21); 606 nm (3.92).

5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl-*N*-2',3'-dibromoprop-2'-ene) porphyrinato Zn(II) (7)

Yield: $\geq 95\%$; MS HRMS ESI⁺ calcd. for C₅₂H₃₆Br₈N₈Zn: 1467.58. Found 881.08 ([M⁺-3xC₃H₃Br₂], 35%), 441.05 ([M²⁺-3xC₃H₃Br₂], 50%). UV-vis, λ_{\max} (emulsion 5 μ M) (log \square): 426 nm (5.17), 559 nm (3.89); 598 nm (3.38); fluorescence (emulsion 5 μ M), λ_{ex} : 421 nm, λ_{em} : 609 and 656 nm.

5,10,15,20-Tetra(4-pyridyl(*N*-propane)) porphyrinato Cu(II) (9)

Yield $\geq 95\%$; UV-vis, λ_{\max} (methanol) (log \square): 411 nm (4.74), 539 nm (3.70).

2,3,7,8,12,13,17,18-Octabromo-5,10,15,20-tetra(4-pyridyl(*N*-propane)) porphyrinato Cu(II) (10)

Bromine (4.5 mmol) in DMF (1 mL) was slowly added to a solution of 9 (0.1 mmol) in DMF (25 mL) over a period of 20 min at room temperature. The resulting mixture was stirred for 12 h. Water (25 mL) was added and porphyrin was collected by filtration under vacuum. Yield 60-85 %. MS HRMS ESI⁺: calcd for C₅₂H₄₄N₈Br₈Cu: 1474.6451. Found 368.1909 (M⁴⁺, 100%), 352.2154 ([M-Cu]⁴⁺ 65%); 432.87 ([M-C₃H₇Br₂]³⁺, 50%). UV-vis λ_{\max} (emulsion 5 μ M) (log ϵ): 450 nm (4.35), 584 nm (3.72).

Drug formulation

Porphyrin (10) is not water-soluble and thus was formulated as Cremophore EL emulsion to impart solubility as previously published³⁵. Briefly, freshly synthesized 10 was air-dried in the dark, dispersed in a mixture of methanol (containing 10% Cremophore EL) and CHCl_3 (1:5) and sonicated 20 min. Methanol and CHCl_3 were removed by rotary evaporation under reduced pressure. PBS was added to the viscous and colored liquid and carefully mixed. Compounds 2 to 9 dissolved well in water, ethanol and particularly in methanol. Methanol was used as the solvent for calibration by spectrophotometer, using the intensity of the Soret band (λ = maximum of the peak at 411-450 nm; ϵ = 170 000 to 190 000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). For uniformity in drug formulation, all porphyrins were emulsified according to the procedure described for 10. The resulting emulsions were filtered sterile on a 0.22 μm Millipore filter. These stock solutions were diluted in PBS or in sterile medium prior to use.

Cells and culture conditions

Human breast carcinoma MDA-MB-231 cells (ATCC, Rockville, MD) in minimum essential medium (MEM) (Sigma-Aldrich), 10% fetal bovine serum, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 2 U/mL penicillin G, 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ streptomycin and 250 ng/mL amphotericin B were incubated at 37°C under 5% CO_2 . Cells were incubated with the porphyrins for 3 h at 1 μM in 0.1% Cremophore EL in MEM without serum, shielded from light³⁵.

Phototoxicity assay

Cells in logarithmic growth phase were seeded (1.5×10^5 per well) in a 96-well plate. Two columns per plate did not receive cells to serve as blanks and two other columns per plate served as controls of cells without porphyrins. After 18 h, cells were washed and incubated with porphyrins for 3 h. Wells were washed twice with PBS and filled with MEM for illumination with visible light (two 500 W tungsten/halogen lamps fitted with a 5 cm filter containing water) at 25.3 mW cm^{-2} . Metabolic survival was assessed with a MTT assay, using the tetrazolium salt MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma-Aldrich)³⁶. Eight replicates were done for each experimental condition. Experiments were repeated 4 times. Statistical analysis used standard deviation and match-paired Student *t*-test.

Radiotoxicity assay

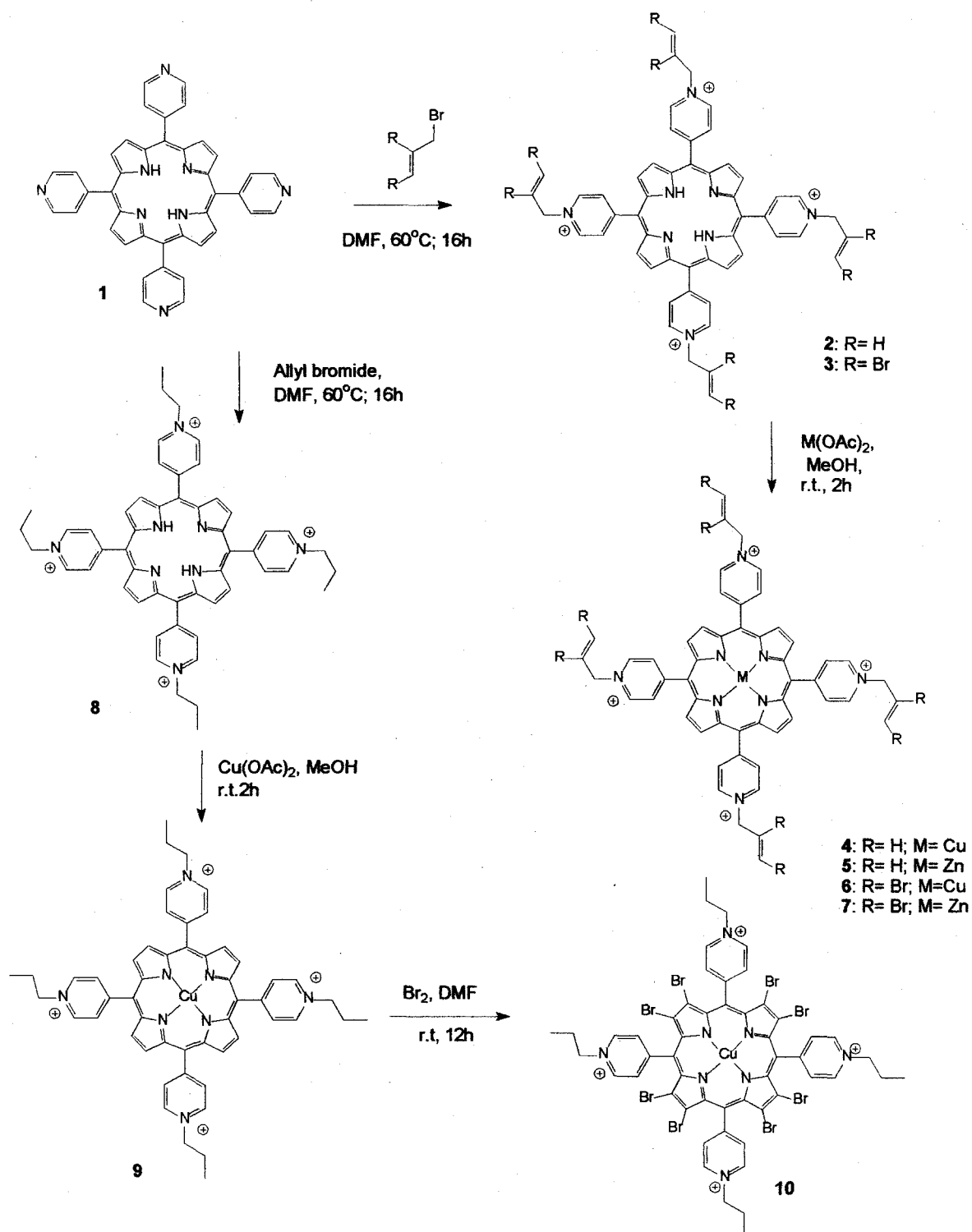
Cells in logarithmic growth phase were incubated with porphyrins ($1 \mu\text{M}$, 3 h), then washed twice with PBS and harvested. After suspending in MEM medium without serum, 1.0×10^5 cells/mL were irradiated with gamma rays of 1.17 and 1.33 MeV (0-6 Gy), delivered by a ^{60}Co source (Gammacell 220, MDS Nordion). Cells were plated in 100 mm Petri plates: 1000 cells (0-2 Gy); 10 000 cells (4 Gy); 25 000 cells (6 Gy). Cells were incubated for 9 to 14 days for the clonogenic assay³⁷. Colonies were stained with crystal violet and counted, considering 50 cells per colony as the threshold of viability. Each experimental condition was carried in triplicates. Experiments were repeated 4 times. Statistical analysis used standard deviation and match-paired Student *t*-test.

Cell uptake

Cellular uptake was determined after incubation with 10 μM of porphyrin for 3 h in MEM without serum. Cells were then washed with PBS pH 7.4 and 1 mL of lysing buffer (0.6 % SDS and 0.1 M EDTA pH 7.4) was added in the Petri dishes followed by an incubation at 37°C for 1 h. Cell extracts were diluted (1:1) in DMF and the porphyrins were quantified by absorbance using a HITACHI U-2000 spectrophotometer. The protein concentration was determined using the Bio-Rad DC Protein Assay (Bio-Rad, Hercules, CA). Cells incubated without porphyrins were used as background. The efficacy of porphyrins extraction was determined by adding 10 μM porphyrins to cell extracts which were obtained from cells not incubated with these drugs. Cellular uptake is reported as moles of porphyrin per mg of cell proteins.

Singlet oxygen quantification

Singlet oxygen production by the porphyrin derivatives was measured using 9,10-diphenylanthracene (DPA, Aldrich) as chemical trap³⁸. Briefly, 0.7 ml of 2 μM porphyrin in DMF, containing 85 μM of DPA, was placed in a quartz cuvette, which was exposed to visible light (two 500 W tungsten/halogen lamps fitted with a 5 cm filter containing water) for 5 min (3.3 J/cm²). Upon oxidation by singlet oxygen DPA is converted to the stable 9,10-diphenylanthracene endoperoxide (DAP) which no longer absorbs light at 395 nm. The loss of DPA is directly proportional to the amount of singlet oxygen produced. DPA concentrations were monitored before and after irradiation by measuring its absorption at 395 nm. The amount of singlet oxygen was calculated using change in absorbance and an extinction coefficient for DPA at 395 nm of 12389 M⁻¹ cm⁻¹. Each assay was repeated three times.



Scheme 1

Fluorescence staining

MDA-MB-231 cells were seeded at 3.9×10^3 cells/cm² onto circular 22 mm diameter glass coverslips placed in 6-well plates and incubated for 18 h at 37°C. Cells were then washed twice with PBS and incubated with 1 μ M porphyrins in MEM medium without serum for 3 h at 37°C, shielded from light. Cells were delicately washed 3 times with Hank's balanced salts solution (HBSS) with 20 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES). Mitochondria were colored with 150 nM Myto tracker green (Invitrogen inc., Canada) and nuclei were colored using 10 nM Syto 13 green (Invitrogen inc., Canada), in HBSS with 20 mM HEPES for 60 min at 37°C. Cells were delicately washed twice with HBSS with 20 mM HEPES at 4°C. Cover glasses were mounted on slides with Vectashield mounting medium (Vector Laboratories, Peterborough, U.K.)

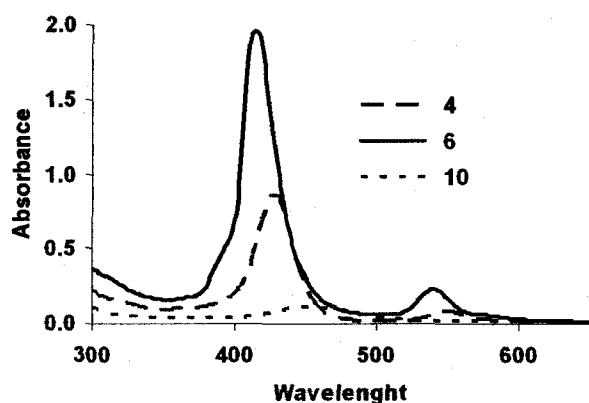


Fig. 1 Effect of the position of bromine substitution on UV-vis spectra of cationic porphyrins. Substitution on β -positions (10) decreases drastically the absorbance and leads to a red-shift of the Soret band. Bromination of *N*-allyl positions (6) increases the intensity of both Soret and Q-bands. Reference porphyrin without bromine (4).

Confocal microscopy

Cells were examined with a scanning confocal microscope (FV1000, Olympus) coupled to an inverted microscope fitted with a 63x oil immersion objective (Olympus). Specimens were laser-excited at 488 nm (40 mW Argon laser) and 633 nm (Helium-Neon laser). In order to avoid cross-talk between the emitted SYTO 13 and porphyrin, fluorescence images were collected sequentially at wavelengths of 500-530 nm and > 650 nm, respectively. Optical sections of 256 x 256 pixels (optical resolution: lateral - 0.207 μm ; axial - 0.8 μm) were taken. Images were acquired typically from 10 cells per experimental condition.

Image analysis

For Alexa 488/Cy5 merged fluorescence images the dots fluorograms were obtained by plotting pixel values of each component towards horizontal and vertical axis, respectively. For illustration purposes, images were contrast enhanced, pseudo-colored accordingly to their original fluorochromes, merged (FluoView software (Olympus)), then cropped and assembled

Results

Synthesis

As shown on scheme 1, all quaternized porphyrin analogs bearing four *N*-alkyl substituents were prepared by the modification of a previously published procedure³⁴. For the preparation of the non-brominated analogs, compound **1** was quaternized with allylbromide to give the tetrapropene derivative **2**, which on treatment with Cu(OAc)₂ or Zn(OAc)₂ in methanol (2 h) gave **4** and **5**, respectively. The brominated analogs were prepared by treatment of **1** with 1,2,3-tribromopropene to give the *N*-(1,2-dibromo)-tetrapropene derivative **3**, which on treatment with Cu(OAc)₂ or Zn(OAc)₂ in methanol (2 h) gave **6** and **7**, respectively.

For the preparation of the β -octabromo analog **10**, compound **1** was treated with 1-bromopropane in DMF at 60°C to yield the quaternized product **8**, which was subsequently metalated with Cu(OAc)₂ in methanol at 25°C to yield **9**. Bromination at the β -position of **9** was accomplished by treatment with Br₂ in DMF (12 h at room temperature) to give **10** as a major product (up to 85%). The product was precipitated with cold water, filtered on fritted glass, washed several times with pure water and air-dried³⁹. HPLC analysis showed the presence of two minor peaks. Mass spectral analysis confirmed the presence of octabrominated porphyrin, along with hepta- and hexabrominated porphyrin impurities. Attempts to obtain exclusively the octabromo product failed even after prolonged reaction time, or varying the amount of the bromine, accordingly the material was used as is for biological studies. Attempts to remove the Cu metal from **10** failed even in strong acidic conditions (H₂SO₄ 95%, conc. HCl

and TFA)³⁹.

Attempts to synthesize the Zn analog of **10** failed. Bromination on the β -position was initially performed using *N*-bromosuccinimide in CH₃OH at reflux, as previously reported^{40, 41}. However, the desired product could not be isolated. Bromination of a similar Zn porphyrin on the β -position with Br₂ in chloroform/methanol has been reported⁴². Our attempts of β -bromination with Br₂ in methanol and in DMF of Zn analog of **9** failed and porphyrin degradation products were observed.

All products, excepted compound **10**, were isolated from the reaction mixture by precipitation with diethyl ether. The purity and homogeneity of the products were established by analytical HPLC. Products were characterized by UV-vis and mass spectral analysis (ESI and MALDI-TOF).

Fluorescence and UV-vis spectrometry

The fluorescence emission and UV-vis spectral data of these cationic porphyrins are listed in the Materials and Methods section. For non-metalated (**2** and **3**) and Zn porphyrins (**5** and **7**), the fluorescence maxima show large bands (between 600 and 750 nm) upon excitation by visible light at the Soret band. For Cu porphyrins (**4**, **6** and **10**), no fluorescence could be detected upon excitation. The UV-vis spectra of porphyrins **2** to **7** were similar with an intense Soret band at 427 ± 13 nm and weaker Q bands with similar extinction coefficients in the 510–660 nm regions. Spectral properties of the porphyrins are affected by the position of the

bromines. Substitution on the β -position (**10**) decreases drastically the absorbance and leads to a red-shift of the Soret band. Conversely, bromination on *N*-allyl positions (**6**) results in a blue-shift and an increase in absorption (Fig. 1). The absorbance spectra of porphyrins without metal or with Cu are very similar, whereas insertion of Zn leads to a modest red-shift.

Table 1 Photo- and radiotoxicity of porphyrin derivatives, together with cell uptake and singlet oxygen production

Porphyrins	Metal	Bromines¹	Cell uptake (mole x 10 ⁻⁸ /mg protein)	Singlet oxygen production ($\mu\text{M} / 10 \mu\text{M}$ porphyrin)	LD₅₀ (J/cm ²)	LD₅₀ y (Gy)
2	Free	No	0.29 ± 0.02	9.5 ± 1.5	15.3 ± 2.2	3.6 ± 0.9
3	Free	Yes	0.39 ± 0.01	4.8 ± 0.2	4.1 ± 0.6	1.2 ± 0.4
4	Cu	No	0.45 ± 0.04	0	> 45.0	2.3 ± 0.5
5	Zn	No	0.64 ± 0.04	6.3 ± 0.2	7.9 ± 1.0	4.4 ± 1.3
6	Cu	Yes	3.63 ± 0.16	0	> 45.0	1.3 ± 0.5
7	Zn	Yes	2.27 ± 0.39	5.1 ± 0.1	11.7 ± 1.2	1.3 ± 0.3
10	Cu	Yes	N.D. ²	0	> 45.0	1.6 ± 0.7
No drug	-	-	-	-	> 45.0	1.6 ± 0.3

¹ Porphyrins **3**, **6** and **7** feature bromines on *N*-allyl positions. Porphyrin **10** has bromines attached on β -positions.

² Not determined due to the instability of porphyrin **10**.

Stability

All compounds tested, except **10**, were stable as a solid at 4°C in the dark for several months. All compounds tested, except **10**, when formulated at 5 µM in 0.5% Cremophore EL, were stable for at least 2 weeks. Conversely, a progressive decomposition, as assessed by a decrease of absorbance, was observed when the porphyrins bearing 8 bromines on *N*-allyl position (**3**, **6** and **7**) were formulated at 5 µM in 0.5% EtOH in PBS at 4°C in the dark. Non-brominated porphyrins (**2**, **4** and **5**) were stable for more than 5 days under the same conditions.

After an irradiation of 100 Gy or 68 J/cm² illumination, porphyrins bearing 8 bromines on *N*-allyl position (**3**, **6** and **7**) remained stable when formulated in 0.5% Cremophore EL, but not in 0.5% EtOH in PBS. Regarding the porphyrins without bromine (**2**, **4** and **5**), they remained stable in both formulations after either 100 Gy or 68 J/cm² illumination.

Mass spectrometry

The assigned structures of the final products were confirmed using MALDI and ESI⁺ mass spectroscopy. ESI⁺ was performed in a mixture of H₂O/CH₃CN (1:1). Fragmentation pattern showed variations in relative intensity of multiple charged molecular ions and loss of *N*-alkyl groups attached to the *N*-atom of the pyridine rings. In the case of compounds **4** and **10**, the M⁴⁺ ion represented 100% relative intensity while compound **2** yielded the M³⁺ ion as 100%. ESI⁺ spectra of *N*-bromoalkyl compounds are more complex due to the loss of the *N*-side chain. To obtain a more informative spectrum and molecular ion peak, we also used MALDI-TOF. Different matrix systems were used but none gave improves spectra as compared top ESI⁺ and only small peaks corresponding to loss of the side chains were observed.

Comparison of MS spectra of **3** using ESI⁺ and MALDI-TOF techniques, shows that fragmentation occurs at the positively charged *N*-allyl position combined with loss of central metal, in agreement with other reports⁴³⁻⁴⁵. A small peak corresponding to the dibromopropene substituent is also detected ($m/z = 198$) using ESI⁺. MALDI-TOF was done with matrix (dithranol) or without matrix. This technique also gave the peaks corresponding to the loss of the side chain.

Cell photosensitization

The breast cancer cells were incubated for 3 h with 1 μ M of porphyrin derivatives **2-7** or **10** and irradiated with the full spectrum of visible light at various doses.

Compounds bearing a Cu as a central metal, i.e. **4**, **6** and **10**, were devoid of any photosensitizing effect which correlated with their incapacity to produce singlet oxygen (Table 1). This result is in accordance with other studies showing that porphyrins substituted with Cu cannot generate singlet oxygen (for review see¹⁶).

Addition of a central Zn (**5**) improved the LD₅₀ by 2-fold compared to the metal-free analog **2**. Although the substitution with Zn significantly (P value < 0.05) reduced the production of singlet oxygen, the cell uptake was improved by 2-fold suggesting that the higher photosensitization obtained with compound **5** was caused a better ability to accumulate in the MDA-MB-231 cells.

Reduction of singlet oxygen production was also associated with the addition of bromines on

the *N*-ally position. Capacity of the metal free porphyrin **3** bearing bromines to produce singlet oxygen was reduced by 2-fold compared to its non-brominated analog **2**. Nevertheless, substitution of bromines increased the photosensitizing activity. Porphyrin **3** was the most potent compound exhibiting a $LD_{50} = 4.1 \pm 0.6 \text{ J/cm}^2$, compared to a $LD_{50} 15.3 \pm 2.2 \text{ J/cm}^2$ for the non-brominated analog **2**. This enhancement obtained with compound **3** could in part be related to a 30% increase of cell uptake.

Metallation of compound **3** with Zn (i.e. **7**) greatly increased the accumulation of the cationic porphyrin in MDA-MB-231 cells (Table 1). Surprisingly, the LD_{50} of the porphyrin substituted with Zn (**7**) was reduced from $11.7 \pm 1.2 \text{ J/cm}^2$ to $4.1 \pm 0.6 \text{ J/cm}^2$ compared to the non-substituted analog **3**, although similar capacities to produce singlet oxygen were measured.

Cell radiosensitization

Breast cancer cells MDA-MB-231 were incubated with porphyrins **2-7** or **10** at $1 \mu\text{M}$, i.e. a concentration that did not induce any toxicity in the absence of radiation. After 3 h incubation, MDA-MB-231 cells were irradiated (0-6 Gy).

Bromination of porphyrins **2**, **4** and **5** to yield analogs **3**, **6** and **7** improved their radiosensitizing capacity by a factor 2-3. In the case of the metallated analogs **6** and **7** this enhanced activity was paralleled by a substantial increase in MDA-MB-231 cell uptake (Table 1). Position of the bromine attachment on the porphyrin did not affect the radiosensitizing activity; similar LD_{50}

were measured for the porphyrin bromination on the *N*-allyl (**6**) or β -position (**10**) position (*P* value > 0.5). Although metallation of the brominated porphyrin **3** with Cu (**6**) or Zn (**7**) enhanced cell uptake, their radiosensitizing potential remained similar. It is noteworthy that all three non-brominated cationic porphyrins (i.e. **2**, **4** and **6**) exerted a weak radioresistance onto the MDA-MB-231 cells (Table 1).

Since porphyrins **4**, **6**, **10** do not fluoresce due to the central Cu, we did not attempt to visualize their cell distribution by confocal microscopy. Localisation of porphyrins without metal (Fig. 2) and with Zn (data not shown) was similar and was not affected by the bromines. The brominated *N*-allyl porphyrin (**3**) and its unsubstituted analog (**2**) were mainly observed in the mitochondria (Fig. 2A), although a significant accumulation was noted in the nucleus (Fig. 2B).

Discussion

Cationic porphyrins strongly interact with DNA solubilized in water^{4-6, 46} and have previously been studied for their photosensitization properties⁴⁵. However, little is known about the effect of bromo substitution on their photo- and radiosensitizing properties. Here, we evaluated the effect of bromination on the β - and *N*-allyl positions of cationic porphyrins on both their photo- and radiosensitizing potencies using MDA-MB-231 human breast carcinoma cells.

The addition of bromine atoms on the *N*-allyl positions of non-metalated porphyrins, i.e.

compounds **3**, improves both its photo- and radiosensitizing properties. In structurally related phthalocyanines, the addition of bromine substituents increases the triplet state formation and hence, the generation of singlet oxygen⁴⁷. In the present study we found that bromination of cationic porphyrins led to a reduction in singlet oxygen production. Thus the non-brominated porphyrins (**2**, **5**) showed a higher capacity for singlet oxygen production as compared to their brominated analogs (**3**, **7**). Nevertheless, the photosensitizing potential of brominated porphyrin **3** was found to be 3-fold higher as compared to that of the non-brominated parent porphyrin **2**. This enhancement could in part be related to a 30% increase in cell uptake (Table 1). All cationic porphyrins tested showed uptake by the nucleus, although the highest sub-cellular accumulation was found in the mitochondria. Bromination of the cationic porphyrins did not modify their distribution in the MDA-MB-231 cells. The high photosensitization potential observed with compound **3** appears therefore not to be associated with a preferential accumulation in DNA. Since our confocal data are insufficient accurate to allow quantitative estimates of porphyrin uptake in subcellular organelles, we cannot associate the photosensitizing effect with a specific subcellular target.

The effect of the nature of the central metal ion on the photosensitizing properties of porphyrin-based photosensitizers has been well established. Photo-excited Cu-porphyrins have short half-lives and lack phototoxicity¹⁶. Addition of bromines on *N-allyl* or β -positions of Cu-porphyrin **4** to yield **6** and **10**, respectively, did not improve photosensitizing properties and all three porphyrins lacked potential to produce singlet oxygen. In contrast both the brominated metal-free porphyrin (**3**) and its Zn analog (**7**), showed good capacities for singlet oxygen production

(Table 1) These observations are in line with those reported for cationic porphyrins bearing four *N*-methyl substituents, where singlet oxygen production was found to be similar for the metal-free and the Zn derivatives⁴⁸.

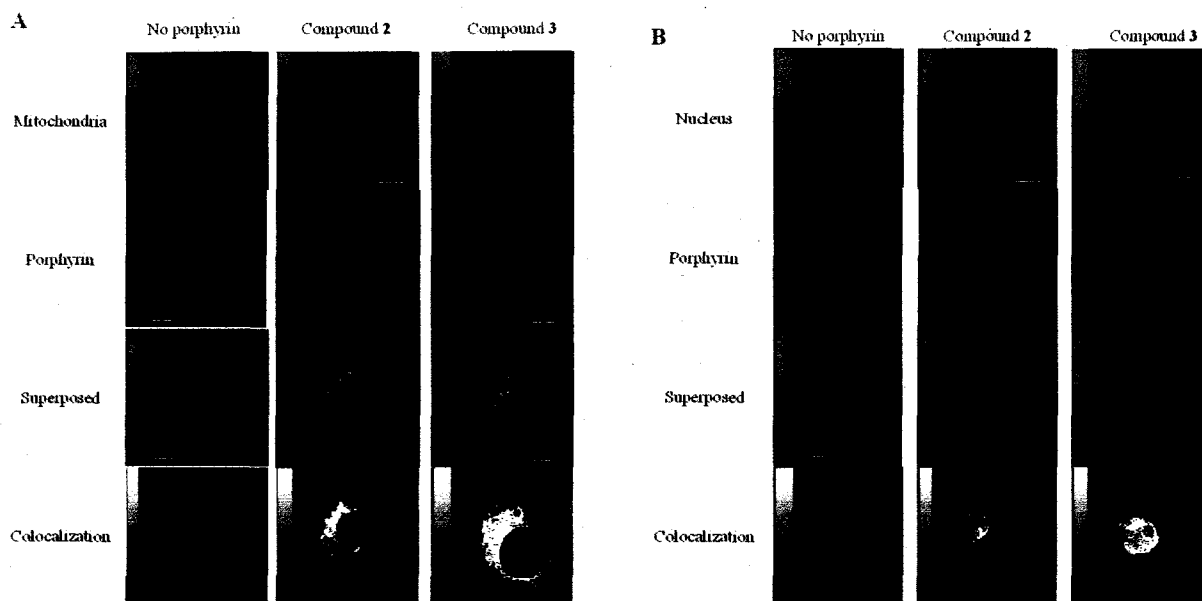


Fig. 2 Cellular localization of cationic porphyrins observed by confocal microscopy. MDA-MB-231 cells incubated for 3 h with 1 μ M of porphyrins 2 or 3 were then incubated with either the Mitotracker green (A), or the Syto 13 green (B) to stain respectively the mitochondria or the nucleus

Regarding the radiosensitizing potential of our cationic porphyrins, neither the presence nor nature of a central metal did affect their activities. This, in spite of substantial differences in cell uptake values that showed a 6-10 fold increase in uptake following substitution of the metal-free porphyrin (3) with Cu (6) or Zn (7). Their cellular localization patterns were also comparable, suggesting saturation of their radiosensitizing activities was reached.

Conversely, bromination of cationic porphyrins on both β - or *N*-allyl positions increased the radiosensitizing activity. However, bromination on *N*-allyl position is preferable since these porphyrins were found to be more stable. Overall, our data suggest that bromination favours the formation of reactive cytotoxic species while the central metal ion does not significantly affect this process, at least under our experimental conditions using a porphyrin concentration of 1 μ M. It is noteworthy that incubation with metal free, non-brominated cationic porphyrin (2) induced some radioresistance in the MDA-MB-231 cells. This radioprotective effect remains to be further explored. Our data suggest that the radiosensitizing enhancement through *N*-allyl bromination should also be explored using alternative carrier molecules.

In vitro assays with MDA-MB-231 cells were all carried out with 1 μ M porphyrin, i.e. a non-cytotoxic concentration in the absence of radiation. It has been shown that a higher radiosensitizing effect of brominated cationic porphyrins can be obtained at a concentration of 10 μ M, i.e. a concentration that induced mild cytotoxicity in the absence of radiation³⁴. Similarly, the supra-additive synergistic effect of radiation in combination with agents such as cisplatin or 5-fluorouracil is frequently measured at drug concentrations that are toxic for

cancer cells⁴⁹. Therefore, the radiosensitizing effect of our brominated cationic porphyrins can likely be improved using higher drug concentration that induce some degree of cytotoxicity without radiation.

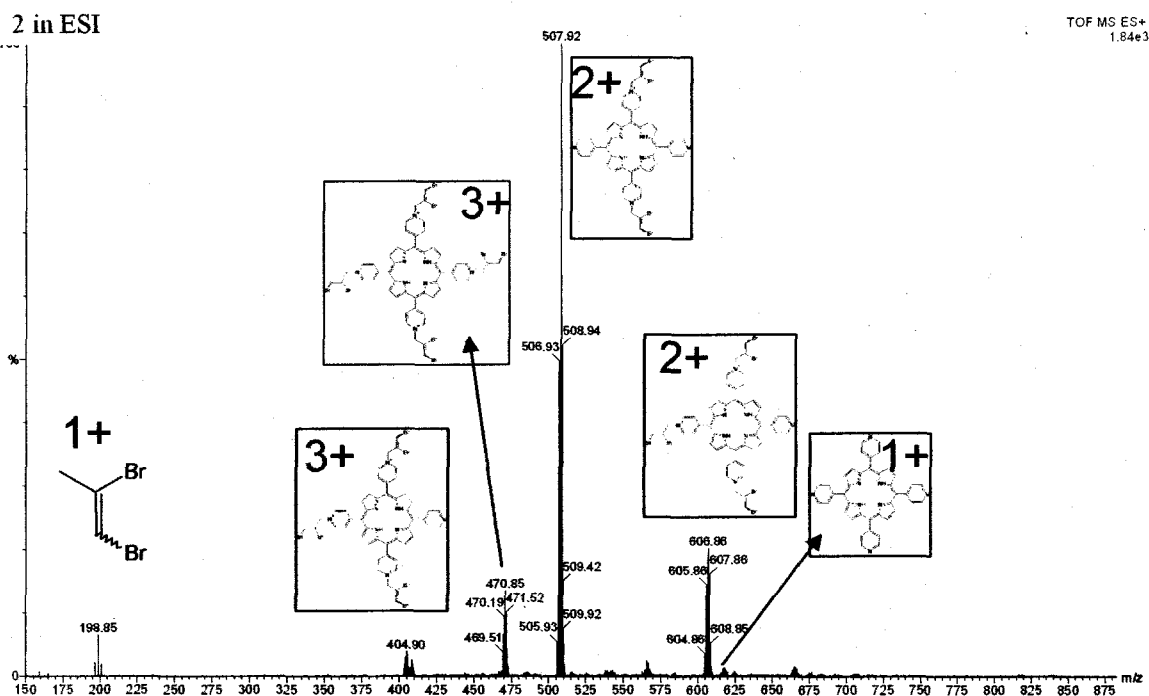


Fig. 3A: Mass spectrometry of compound in electrospray (ESI). Reduction of N⁺ from N-pyridyl ring and loss of N-allyl brominated arms observed. Even the dibromopropene arm alone is detected in the mass spectrometer. Other groups reported reduction of N⁺ on N-pyridyl ring in mass spectrometry with loss of moieties previously attached there. {{335 Ramos,C.I. 2007;281 Silva,E.M. 2006; }}Suggested chemical structures are drawn in rectangles, though exact status of protonation is uncertain due to uncertainty in mass ± 2 units per bromine atom on the molecule. 2 main isotopes of bromine exist in nature, sharing almost 50% each of abundance: ⁷⁹Br and ⁸¹Br.

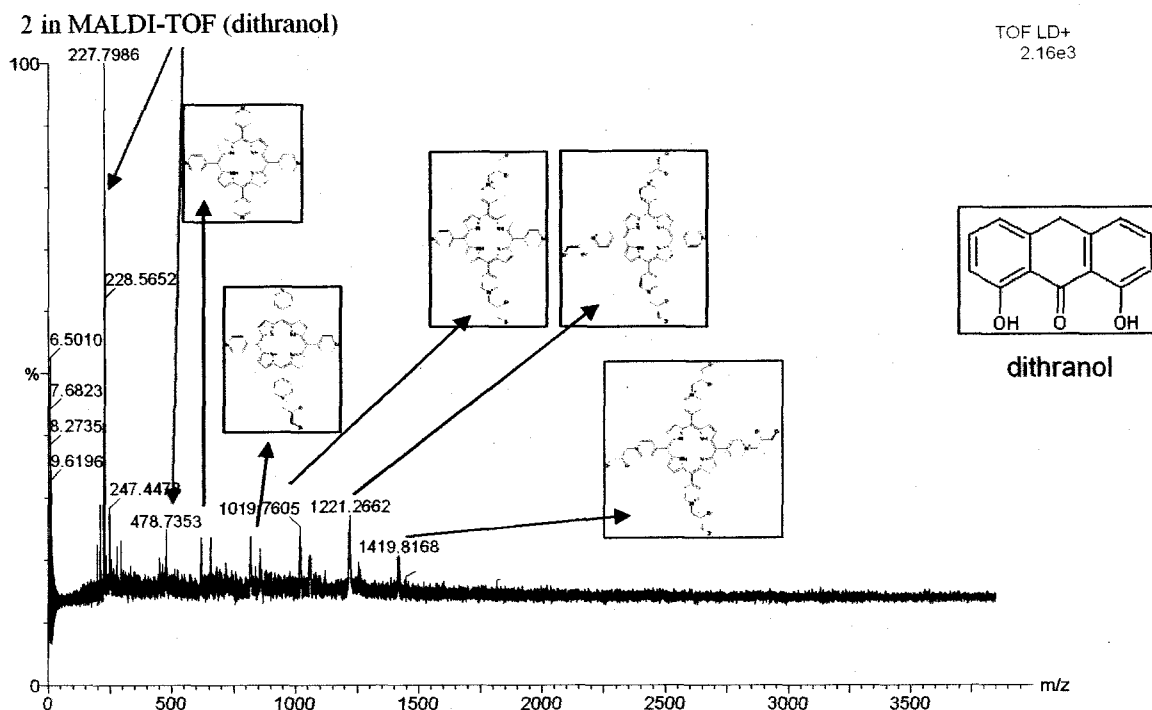


Fig. 3B : Mass spectrometry of compound 2 in Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight (MALDI-TOF) with dithranol matrix. Reduction of N^+ from *N*-pyridyl ring and loss of brominated *N*-allyl arms observed.

Conclusions

Our data show that addition of bromine atoms to the *N*-allyl positions of cationic porphyrins improves their potential to sensitize cancer cells to photons of visible light and ionizing radiation. A 4-fold increase in photocytotoxicity is observed with the non-metalated, *N*-allyl analog, compound 3. In the case of the radiosensitizing potency, the overall enhancement in activity due to bromination is modest, particular if taken into account that the non-brominated analogs exhibit some radioprotective activity under our experimental conditions.

Acknowledgements

This research project was funded by the Canadian Breast Cancer Alliance of Canada, grant # 13434. Benoit Paquette and Johan E. van Lier are members of the FRSQ-funded Centre de recherche clinique Étienne-LeBel. The authors want to thank Peggy Regulus Ph.D. for help in mass spectrometry, Nicole Cauchon Ph.D. for the phototoxicity assays and Dr Leonid Volkov for the confocal microscopy analysis.

References

1. W. M. Sharman, C. M. Allen and J. E. van Lier, Role of activated oxygen species in photodynamic therapy, *Methods Enzymol.*, 2000, **319**, 376-400.
 2. A. Juzeniene, Q. Peng and J. Moan, Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2007, **6**, 1234-1245.
 3. A. Villanueva and G. Jori, Pharmacokinetic and tumour-photosensitizing properties of the cationic porphyrin meso-tetra(4N-methylpyridyl)porphine, *Cancer Lett.*, 1993, **73**, 59-64.
 4. T. Murashima, D. Sakiyama, D. Miyoshi, M. Kuriyama, T. Yamada, T. Miyazawa and N. Sugimoto, Cationic porphyrin induced a telomeric DNA to g-quadruplex form in water, *Bioinorg Chem. Appl.*, 2008, 294756.
 5. Y. Ishikawa, T. Yamashita, Y. Tomisugi and T. Uno, Interaction of porphyrins bearing peripheral cationic heterocycles with G-quadruplex DNA, *Nucleic Acids Res. Suppl.*, 2001, **1**, 107-108.
 6. T. Yamashita, T. Uno and Y. Ishikawa, Stabilization of guanine quadruplex DNA by the binding of porphyrins with cationic side arms, *Bioorg. Med. Chem.*, 2005, **13**, 2423-2430.
 7. F. M. Engelmann, I. Mayer, D. S. Gabrielli, H. E. Toma, A. J. Kowaltowski, K. Araki and M. S. Baptista, Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 2007, **39**, 175-185.
 8. N. M. Inada, A. R. da Silva, R. A. Jorge, J. Borecky and A. E. Vercesi, Irradiated cationic mesoporphyrin induces larger damage to isolated rat liver mitochondria than the
-

-
- anionic form, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007, **457**, 217-224.
9. M. Schaffer, B. Ertl-Wagner, P. M. Schaffer, U. Kulka, A. Hofstetter, E. Duhmke and G. Jori, Porphyrins as Radiosensitizing Agents for Solid Neoplasms, *Curr. Pharm. Des.*, 2003, **9**, 2024.
 10. Z. Luksiene, Experimental evidence on possibility to radiosensitize aggressive tumors by porphyrins, *Medicina (Kaunas)*, 2004, **40**, 868-874.
 11. Z. Luksiene, P. Juzenas and J. Moan, Radiosensitization of tumours by porphyrins, *Cancer Letters*, 2006, **235**, 40-47.
 12. S. W. Young, F. Qing, A. Harriman, J. L. Sessler, W. C. Dow, T. D. Mody, G. W. Hemmi, Y. Hao and R. A. Miller, Gadolinium(III) texaphyrin: a tumor selective radiation sensitizer that is detectable by MRI, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, **93**, 6610-6615.
 13. S. Mukherjee, J. Abraham, A. Brewster, R. Hardwick, T. Havard, W. Lewis, C. Askill, J. Manson, G. T. Williamst, S. A. Roberts, J. Court and T. Crosby, Pilot study of preoperative combined modality treatment for locally advanced operable oesophageal carcinoma: toxicities and long-term outcome, *Clin. Oncol. (R. Coll. Radiol)*, 2006, **18**, 338-344.
 14. H. Choy, C. Park and M. Yao, Current status and future prospects for satraplatin, an oral platinum analogue, *Clin. Cancer Res.*, 2008, **14**, 1633-1638.
 15. J. A. O'Hara, E. B. Double, M. J. Abrams, D. J. Picker, C. M. Giandomenico and J. F. Vollano, Potentiation of radiation-induced cell kill by synthetic metalloporphyrins, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1989, **16**, 1049-1052.
-

-
16. H. Ali and J. E. van Lier, Metal complexes as photo- and radiosensitizers, *Chem. Rev.*, 1999, **99**, 2379-2450.
 17. M. Schaffer, P. M. Schaffer, L. Corti, M. Gardiman, G. Sotti, A. Hofstetter, G. Jori and E. Duhmke, Photofrin as a specific radiosensitizing agent for tumors: studies in comparison to other porphyrins, in an experimental in vivo model, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2002, **66**, 157-164.
 18. Z. Luksiene, D. Labeikyte, B. Juodka and J. Moan, Mechanism of radiosensitization by porphyrins, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.*, 2006, **25**, 293-306.
 19. M. Schaffer, B. Ertl-Wagner, P. M. Schaffer, U. Kulka, G. Jori, R. Wilkowski, A. Hofstetter and E. Duhmke, Feasibility of photofrin II as a radiosensitizing agent in solid tumors--preliminary results, *Onkologie*, 2006, **29**, 514-519.
 20. U. Kulka, M. Schaffer, A. Siefert, P. M. Schaffer, A. Ölsner, K. Kasseb, A. Hofstetter, E. Dühmke and G. Jori, Photofrin as a radiosensitizer in an in vitro cell survival assay, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, **311**, 98-103.
 21. G. M. Richards and M. P. Mehta, Motexafin gadolinium in the treatment of brain metastases, *Expert Opin. Pharmacother.*, 2007, **8**, 351-359.
 22. J. Viala, D. Vanel, P. Meingan, E. Lartigau, P. Carde and M. Renschler, Phases IB and II multidose trial of gadolinium texaphyrin, a radiation sensitizer detectable at MR imaging: preliminary results in brain metastases, *Radiology*, 1999, **212**, 755-759.
 23. C. A. Meyers, J. A. Smith, A. Bezjak, M. P. Mehta, J. Liebmann, T. Illidge, I. Kunkler, J. M. Caudrelier, P. D. Eisenberg, J. Meerwaldt, R. Siemers, C. Carrie, L. E. Gaspar, W. Curran, S. C. Phan, R. A. Miller and M. F. Renschler, Neurocognitive function and
-

- progression in patients with brain metastases treated with whole-brain radiation and motexafin gadolinium: results of a randomized phase III trial, *J. Clin. Oncol.*, 2004, **22**, 157-165.
24. D. Larson, W. J. Bodell, C. Ling, T. L. Phillips, M. Schell, D. Shrieve and T. Troxel, Auger electron contribution to bromodeoxyuridine cellular radiosensitization, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1989, **16**, 171-176.
25. C. Le Sech, K. Takakura, C. Saint-Marc, H. Frohlich, M. Charlier, N. Usami and K. Kobayashi, Enhanced strand break induction of DNA by resonant metal-innershell photoabsorption, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, 2001, **79**, 196-200.
26. O. Benka and M. Uda, Resonant electron-transfer relaxation observed in fluorine K-Auger spectra, *Phys. Rev. Lett.*, 1986, **56**, 1667-1670.
27. S. J. Karnas, E. Yu, R. C. McGarry and J. J. Battista, Optimal photon energies for IUdR K-edge radiosensitization with filtered x-ray and radioisotope sources, *Phys. Med. Biol.*, 1999, **44**, 2537-2549.
28. T. J. Kinsella, P. P. Dobson, J. B. Mitchell and A. J. Fornace Jr, Enhancement of X ray induced DNA damage by pre-treatment with halogenated pyrimidine analogs, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 1987, **13**, 733-739.
29. G. Iliakis, S. Kurtzman, G. Pantelias and R. Okayasu, Mechanism of radiosensitization by halogenated pyrimidines: effect of BrdU on radiation induction of DNA and chromosome damage and its correlation with cell killing, *Radiat. Res.*, 1989, **119**, 286-304.
30. T. S. Lawrence, M. A. Davis and D. P. Normolle, Effect of bromodeoxyuridine on
-

-
- radiation-induced DNA damage and repair based on DNA fragment size using pulsed-field gel electrophoresis, *Radiat. Res.*, 1995, **144**, 282-287.
31. S. I. Yang, J. Seth, J. -. Strachan, S. Gentlemann, D. Kim, D. Holten, J. S. Lindsey and D. F. Bocian, Ground and excited state electronic properties of halogenated tetraarylporphyrins. Tuning the building blocks for porphyrin-based photonic devices, *J. Porphyrins Phtalocyanines*, 1999, **3**, 117-147.
32. Y. J. Ko, K. J. Yun, M. S. Kang, J. Park, K. T. Lee, S. B. Park and J. H. Shin, Synthesis and in vitro photodynamic activities of water-soluble fluorinated tetrapyridylporphyrins as tumor photosensitizers, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, **17**, 2789-2794.
33. P. Pal, H. Zeng, G. Durocher, D. Girard, T. Li, A. K. Gupta, R. Giasson, L. Blanchard, L. Gaboury, A. Balassy, C. Turmel, A. Laperriere and L. Villeneuve, Phototoxicity of some bromine-substituted rhodamine dyes: synthesis, photophysical properties and application as photosensitizers, *Photochem. Photobiol.*, 1996, **63**, 161-168.
34. R. Lemay, J. P. Tremblay-Morin, H. Ali, D. Hunting, J. E. van Lier and B. Paquette, Synthesis and Radiosensitizing Properties of Brominated Tetrapyridine porphyrins, *J. Porphyrins Phtalocyanines*, 2007, **11**, 549-555.
35. R. W. Boyle, J. Rousseau, S. V. Kudrevich, M. Obochi and J. E. van Lier, Hexadecafluorinated zinc phthalocyanine: photodynamic properties against the EMT-6 tumour in mice and pharmacokinetics using ^{65}Zn as a radiotracer, *Br. J. Cancer*, 1996, **73**, 49-53.
36. D. Gerlier and N. Thomasset, Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation, *J. Immunol. Methods*, 1986, **94**, 57-63.
-

-
37. N. A. Franken, H. M. Rodermond, J. Stap, J. Haveman and C. van Bree, Clonogenic assay of cells in vitro, *Nat. Protoc.*, 2006, **1**, 2315-2319.
38. Mir, Y., van Lier, J.E., Paquette, B. and Houde, D. Oxygen Dependence of Two-photon Activation of Zinc and Copper Phthalocyanine Tetrasulfonate in Jurkat Cells. *Photochem. Photobiol.*, 2008, **84**, 1182-1186.
39. R. A. Richards, K. Hammons, M. Joe and G. M. Miskelly, Observation of a Stable Water-Soluble Lithium Porphyrin, *Inorg. Chem.*, 1996, **35**, 1940-1944.
40. J. S. Rebouças, Eliza, Maria M.D. de Carvalho and Y. M. Idemori, Perhalogenated 2-pyridylporphyrin complexes: synthesis, self-coordinating aggregation properties, and catalytic studies, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, 2002, **6**, 50-57.
41. C07D 487/22 (2006.01). *Pat.*, WO1991/001985, 1991.
42. F. D'Souza, R. Gollapalli, Deviprasad and M. E. Zandler, Aggregation and axial ligand exchange behavior of water-soluble b-pyrrole brominated porphyrins, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1997, **20**, 3699-3703.
43. E. M. Silva, V. V. Serra, A. O. Ribeiro, J. P. Tome, P. Domingues, M. A. Faustino, M. G. Neves, A. C. Tome, J. A. Cavaleiro, A. J. Ferrer-Correia, Y. Iamamoto and M. R. Domingues, Characterization of cationic glycoporphyrins by electrospray tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, **20**, 3605-3611.
44. C. I. Ramos, M. G. Santana Marques, A. J. Correia, V. V. Serra, J. P. Tome, A. C. Tome, M. G. Neves and J. A. Cavaleiro, Reduction of cationic free-base meso-tris-N-methylpyridinium-4-yl porphyrins in positive mode electrospray ionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 2007, **18**, 762-768.
-

-
45. I. Batinic-Haberle, R. D. Stevens and I. Fridovich, Electrospray mass spectrometry of isomeric tetrakis(*N*-alkylpyridyl porphyrins and their manganese(III) and iron(III) complexes, *J. Porphyrins Phtalocyanines*, 2000, **4**, 217-227.
 46. K. Hirakawa, S. Kawanishi, T. Hirano and H. Segawa, Guanine-specific DNA oxidation photosensitized by the tetraphenylporphyrin phosphorus(V) complex via singlet oxygen generation and electron transfer, *J. Photochem. Photobiol. B.*, 2007, **87**, 209-217.
 47. X.-. Zhang and H. -. Xu, Influence of Halogenation and Aggregation on photosensitizing properties of Zinc Phtalocyanine (ZnPc). *J. Chem. Soc. , Faraday Trans.*, 1993, **89**, 3347-3351.
 48. Ishikawa, Y., Yamakawa, N. and Uno, T. Potent DNA photocleavage by zinc(II) complexes of cationic bis-porphyrins linked with aliphatic diamine. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2002, **10**, 1953-60.
 49. G. D. Wilson, S. M. Bentzen and P. M. Harari, Biologic basis for combining drugs with radiation, *Semin. Radiat. Oncol.*, 2006, **16**, 2-9.
-

5. Résultats non publiés et limitations au projet

5.1. Synthèses chimiques

Initialement, il avait été prévu d'incorporer aussi du cobalt comme métal central pour chaque dérivé de porphyrine. En effet, pour d'autres dérivés métalloporphyrines chargés évalués comme radiosensibilisateurs à une concentration de 50-100 μM , le cobalt (Co), le fer (Fe) et le zinc (Zn) s'avéraient les meilleurs en conditions oxygènes et hypoxiques (O'HARA *et al.*, 1989). Néanmoins, des problèmes majeurs d'oxydo-réduction sont survenus lors des essais de métallation avec le cobalt. En effet, suite à une incubation de quelques heures des porphyrines avec différents sels de cobalt dans les mêmes conditions que pour le zinc ou le cuivre, le chromatogramme montrait plus d'une douzaine de pics, suggérant une dégradation et différents dérivés. Des expériences dans d'autres laboratoires ont montré que la présence d'un atome central de cobalt augmentait le potentiel de rédox et que chaque brome ajouté sur la porphyrine augmentait le potentiel rédox. Les porphyrines étaient stables pour une réduction, mais lors des réductions subséquentes leurs bromes s'éliminaient de la molécule (D'SOUZA *et al.*, 1993). Ce phénomène expliquerait peut-être les problèmes de dégradation. Il aurait peut-être donc fallu utiliser des solvants ultra-purs et empêcher les porphyrines d'entrer en contact avec d'autres impuretés qui puissent favoriser l'oxydoréduction pendant la réaction de métallation. Différents sels ont été essayés, sans succès, dont le chlorure de cobalt hydraté et l'acétate de cobalt. Un dégazage du méthanol suivi d'un bullage en atmosphère inerte ont été tentés pour retirer l'oxygène pendant la métallation : au mieux, trois pics majeurs étaient observés sur le chromatogramme au lieu d'un seul comme pour le produit de départ non métallé. Devant ces difficultés, l'incorporation de cobalt a été abandonnée dans le présent projet. Les décomptes de colonies après irradiation des cellules dans le présent ouvrage ne démontraient aucune différence significative selon le métal central avec ces porphyrines à une concentration de 1 μM ; à cette concentration pharmacologiquement atteignable et

réaliste, l'effet du métal semble négligeable sur l'effet radiosensibilisateur, du moins avec les porphyrines testées dans la présente étude. Quant à l'effet photosensibilisateur, la littérature rapporte une médiocre amélioration des métalloporphyrines portant un Co^{2+} , un Cu^{2+} ou un Fe^{2+} (ALI *et al.*, 1999).

Tel que discuté dans notre article, les analogues du composé **10** non métallé et métallé avec un zinc n'ont pas été testés faute de pouvoir en synthétiser en quantité et pureté satisfaisantes. En effet, l'addition de bromes en position β -pyrrole doit être effectuée sur une porphyrine métallée avec un cuivre, sinon il y a de la dégradation en plusieurs sous-produits. Toutefois, le retrait du cuivre central à l'aide d'acides forts a échoué.

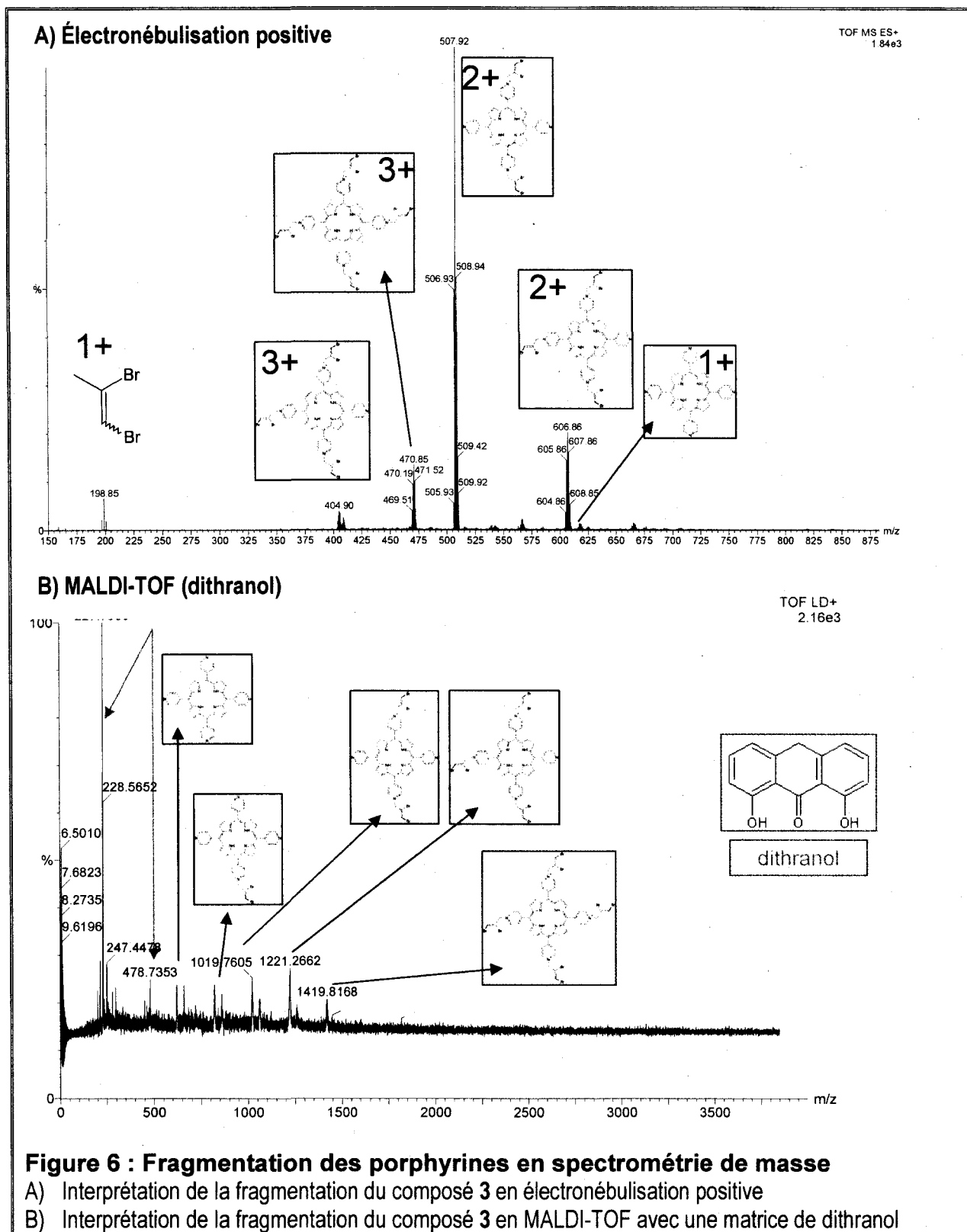
5.2. Spectrométrie de masse

Les spectres de masse, autant en MALDI-TOF qu'en électronebulisation démontrent une fragmentation de la porphyrine, tel qu'abordé brièvement dans notre article. Le fragment attaché en position *N*-allyl est souvent éliminé. Ce lien N-C est l'un des plus faibles de la molécule. Un lien chimique impliquant un N chargé positivement est moins stable. Lorsque la molécule est excitée par le laser du spectromètre de masse MALDI-TOF, il est possible que le surplus d'énergie et/ou d'ions puisse détruire ce lien. Le patron suivant est reproductible en MALDI-TOF : M, M - 1 fragment, M - 2 fragments, M - 3 fragments, M - 4 fragments. Pourtant, il est presque impossible que ces espèces manquant 3 ou 4 fragments en position *N*-allyl préexistaient en solution avant : chaque fragment porte une charge positive rendant la molécule soluble dans l'eau. Sans ces charges positives, la molécule ne serait pas aussi soluble dans l'eau et les solvants polaires comme le méthanol. La porphyrine manquant 4 fragments correspond au réactif de départ qui est complètement insoluble dans l'eau et dans le méthanol. Le même patron de fragmentation est observé reproductiblement en électronebulisation. Même le fragment détaché est clairement observable à 198 Da. Deux exemples de la perte de fragments sur l'atome d'azote (*N*) d'un groupe pyridyl d'une porphyrine cationique ont été publiés dans une revue spécialisée de spectrométrie de

masse (SILVA *et al.*, 2006); (TOMAZELA *et al.*, 2004). De plus, la perte du métal central est parfois observée. Les liens de coordination du métal central peuvent être brisés plus facilement que des liens covalents. Il existe aussi un exemple dans la littérature de perte du cuivre central dans une porphyrine lors de l'analyse par spectrométrie de masse utilisant un laser pour la désorption (DALE *et al.*, 1996).

Ce phénomène de fragmentation pourrait être accentué par la présence de l'oxygène singulet, qui est très réactif. En effet, la matrice utilisée, le dithranol, s'apparente chimiquement aux anthraquinones^v et possède aussi la capacité de générer des espèces réactives de l'oxygène (MULLER *et al.*, 1993). Les porphyrines analysées peuvent elles-mêmes produire l'oxygène singulet.

^v Consulter le Tableau 2 de la section 2.5.2 Les photosensibilisateurs non dérivés de porphyrines.



Enfin, la présence de 8 atomes de brome sur la molécule non métallée complique l'analyse du spectre de masse. L'abondance naturelle de l'isotope ^{79}Br est de 50,697%; celle de l'isotope ^{81}Br est de 49,317%. 8 atomes de brome x 2 isotopes naturels = 16 possibilités au total, dont certaines correspondent à la même masse moléculaire, ce qui résulte en 9 masses possibles pour le même ion moléculaire. Pour la porphyrine métallée avec un cuivre, 18 masses sont possibles (9 masses moléculaires x 2 isotopes du cuivre = 18 masses moléculaires). Il existe deux principaux isotopes stables naturels de cuivre : ^{63}Cu (69,173%) et ^{65}Cu (30,833%). Quant à la porphyrine métallée avec un zinc, 36 masses sont possibles (9 masses moléculaires x 4 isotopes du zinc = 36 masses moléculaires). Il existe quatre principaux isotopes stables naturels de zinc : ^{64}Zn (48,63%), ^{66}Zn (27,92%), ^{67}Zn (4,11%), ^{68}Zn (18,84%). Sur les spectres de masse, il est effectivement possible d'observer la multiplicité des pics autour de la moyenne de la masse de l'ion moléculaire. Avec autant de variabilité, il devient impossible de déterminer avec certitude l'état protoné ou non des fragments.

Il est important de noter qu'il faut absolument éviter d'ajouter toute trace d'acide trifluoroacétique (TFA) dans les échantillons, sinon l'ion moléculaire de ces porphyrines ne pourra pas être observé en électronebulisation. Le mécanisme exact de ce problème est inconnu.

5.3. Quantification des porphyrines accumulées dans les cellules

Puisque les résultats obtenus en microscopie confocale à fluorescence n'étaient pas quantitatifs, d'autres techniques ont été évaluées afin de déterminer la concentration de porphyrines incorporées dans les cellules suite à l'incubation. Des profils d'accumulation cellulaire différents auraient pu contribuer à expliquer les différences d'efficacité observées, c'est-à-dire que si une porphyrine s'accumule 5 fois plus dans la cellule qu'un autre analogue, elle pourrait avoir 5 fois plus d'effet, si l'effet est proportionnel à la dose. Or, aucune corrélation ne peut être établie, selon les résultats de la mesure d'incorporation

cellulaire après une incubation avec 10 μM de porphyrines, suivie d'une lyse cellulaire (voir Tableau 1 dans notre article).

Les porphyrines pourraient avoir subi des modifications chimiques une fois dans la cellule et certains de ces dérivés de porphyrines pourraient être plus actifs que d'autres. Un changement de profil en spectrophotométrie aurait pu indiquer de telles modifications : ajout, retrait ou changement de métal central caractérisé par des changements de bandes Q; oxydation ou autre modification de la porphyrine caractérisée par un déplacement de la bande de Soret; liaison à un récepteur ou autre biomolécule caractérisée par un déplacement du spectre. Par exemple, la ferrochélatase dans les mitochondries aurait pu reconnaître le composé **3** et y incorporer un atome central de fer. Le fer aurait pu contribuer à l'effet radiosensibilisateur (O'HARA *et al.*, 1989). La ferrochélatase peut aussi effectuer la réaction inverse et retirer des atomes de cobalt ou de zinc du centre pour en faire des porphyrines non métallées (TAKETANI *et al.*, 2007).

Les essais de détection des porphyrines directement dans les cellules entières ont échoué. En effet, les composantes cellulaires absorbent davantage que les porphyrines jusqu'à environ 370 nm. Le spectre UV-visible des cellules et la bande de Soret des porphyrines (vers 420 nm) se chevauchent. Le signal de la bande de Soret était camouflé par la forte absorption des cellules, rendant impossible la quantification des porphyrines ou l'observation d'un déplacement du spectre UV-visible, qui aurait pu donner un indice de modification chimique.

Discussion

6. Modifications chimiques des sensibilisateurs et leur impact sur la sensibilisation des cellules cancéreuses

6.1. Comment les atomes de brome augmentent l'effet photosensibilisateur

6.1.1. Hypothèse retenue : augmentation de la durée de la demi-vie l'état excité

Chez des phtalocyanines de structure chimique comparable, l'ajout d'atomes de brome augmente le rendement de formation de l'état excité du photosensibilisateur (ZHANG *et al.*, 1993). Ce phénomène serait attribuable à l'effet des atomes lourds, lequel permet des changements quantiques autrement interdits ($S_1 \rightarrow T_1$) (WAINWRIGHT, 1996). Cet effet devrait en théorie être accentué chez les porphyrines cationiques, car celles-ci se monomérisent bien, alors que les phtalocyanines ont tendance à perdre de l'efficacité à produire l'oxygène singulet à cause de leur aggrégation.

Les atomes de brome sont très électronégatifs: ils attirent les électrons délocalisés et peuvent contribuer à stabiliser plus longtemps un état excité de la molécule. L'ajout de bromes en position *N*-allyl amplifie le nombre de résonances possibles comparativement à une substitution en position β -pyrrole. Plus la demi-vie des porphyrines à l'état excité augmente, plus grande sera la probabilité d'interagir avec l'oxygène et de former l'oxygène singulet. Cette hypothèse expliquerait les résultats obtenus en suggérant cet ordre croissant relatif de demi-vie de l'état excité: bromes en position β -pyrrole \leq sans brome $<$ bromes en position *N*-allyl. L'augmentation de la durée de la demi-vie de l'état excité des porphyrines grâce aux bromes en position *N*-allyl semble la plus plausible, néanmoins il faudrait vérifier cette durée et quantifier la génération d'oxygène singulet dans d'autres expériences de chimie physique.

6.1.2. Toxicité des atomes de brome libres : peu probable

Le brome libre est très réactif et potentiellement très toxique pour les cellules. Évidemment, la purification sur colonne servait à enlever tous les sels et impuretés résiduels de la synthèse chimique des porphyrines. L'excédent d'énergie lors de l'état excité des porphyrines pourrait-il simplement favoriser l'élimination des bromes? Les liens simples carbone-brome sont fragiles: des photons dans l'ultraviolet peuvent causer une rupture homolytique, c'est-à-dire que chaque atome garde son électron non païré. Effectivement, le brome est un excellent atome partant pour une substitution nucléophile. Cependant, chez les porphyrines de cette étude, les carbones porteurs de bromes sont planaires, car ils participent à un lien double et sont hybridés sp^2 , alors la substitution nucléophile ne s'applique pas. Par contre, l'élimination des bromes serait possible, mais la formation d'un intermédiaire carbocation est défavorisée par la charge positive qui existe déjà sur un atome d'azote à proximité. Les résultats des tests de stabilité suggèrent que les porphyrines bromées conservent leur intégrité, car aucun changement significatif du spectre UV-visible ou de la solubilité n'était observable après l'illumination et l'irradiation à 100 Gy.

6.1.3. Toxicité des fragments dibromopropènes : possible mais peu probable

La cellule pourrait avoir acheminé les porphyrines près de son ADN, là où elle est vulnérable aux attaques chimiques. Plusieurs articles dans la littérature scientifique rapportent l'habileté de différentes porphyrines chargées positivement à se lier à l'ADN (chargé négativement) en solution aqueuse (IKAWA *et al.*, 2008); (ZHAO *et al.*, 2008); (ZHANG *et al.*, 2008). Lorsque la lumière excite les porphyrines, celles-ci se fragmenteraient^{vi} et libéreraient du dibromopropène dans l'ADN. Il est connu que le 2,3-dibromopropène réagit avec l'adénosine pour former des nucléosides bromés (QIU *et al.*, 1998). Ces

^{vi} Fragmentation telle qu'observée en spectrométrie de masse, voir Figure 6 de la section 5.2 Spectrométrie de masse.

modifications, en plus des attaques de l'oxygène singulet produit par les porphyrines excitées, pourraient causer des bris dans l'ADN et provoquer la mort cellulaire.

Toutefois, les résultats obtenus lors des tests de stabilité suggèrent que ce mécanisme d'action est peu probable. En effet, le spectre UV-visible des porphyrines en solution demeurait très stable après une illumination prolongée. S'il y avait eu une fragmentation généralisée, les porphyrines auraient précipité et l'intensité de la bande de Soret aurait diminué significativement, puisque les porphyrines auraient perdu leurs charges positives et par conséquent, seraient moins solubles. La formulation dans le cremophore EL^{vii} empêche de réanalyser les échantillons en spectrométrie de masse ou même par HPLC, alors on ne peut pas affirmer hors de tout doute l'absence de fragmentation lors de l'illumination. De surcroît, la fragmentation se produisait dans le spectromètre de masse lorsque les porphyrines étaient excitées avec un laser très puissant qui émet à des longueurs d'onde dans la gamme de l'ultraviolet. Or, les conditions thérapeutiques diffèrent, car les boîtes d'illuminations n'émettaient pas de rayons ultraviolets et l'absence de rayonnement ultraviolet a été confirmée^{viii}. Il semble donc que les porphyrines de la présente étude ne se fragmentaient guère lorsqu'illuminées avec le spectre de la lumière visible.

6.2. Contribution du métal central à l'effet photosensibilisateur

Tel qu'attendu, les porphyrines contenant un atome de cuivre en leur centre n'ont guère démontré d'effet photosensibilisateur. Effectivement, il est connu que le cuivre inactive l'oxygène singulet (JOSHI, 1998). De surcroît, les caractéristiques des métalloporphyrines contenant des ions métalliques réguliers, tel le Zn, avec une configuration d^0 ou d^{10} , sont essentiellement déterminées par les électrons π du

^{vii} Le cremophor EL est une huile de castor polyéthoxylée. Il s'agit d'un excipient servant à stabiliser l'émulsion de porphyrines dans un système aqueux. La porphyrine **10** est insoluble dans l'eau et nécessitait un tel excipient pour être émulsifiée. Afin d'uniformiser, toutes les porphyrines de la présente étude ont été préparées avec la même formulation. Puisque le cremophore EL est une huile visqueuse, il aurait sans doute bloqué la colonne du HPLC.

^{viii} Absence de rayonnement ultraviolet confirmée grâce aux appareils et l'expertise de Dr Antonio Conconi.

macrocycle des porphyrines. Quant au Cu, il s'agit d'un métal de transition avec des orbitales d incomplètes: ces orbitales peuvent significativement s'intégrer avec les orbitales du macrocycle de porphyrine. Ainsi, les états excités des métalloporphyrines contenant un cuivre en leur centre ont une demi-vie très courte et leur rendement quantique de formation de l'état triplet est très faible. Par conséquent, les métalloporphyrines contenant un cuivre en leur centre génèrent très peu d'oxygène singulet, voire pas du tout (MILANESIO *et al.*, 2008).

Quant à la chélation du Fe²⁺ par les porphyrines sans métal central, elle semble peu probable ou du moins négligeable pour expliquer les spectaculaires résultats obtenus en photosensibilisation avec le composé **3** sans métal central. La littérature rapporte que les métalloporphyrines portant un Fe²⁺ en leur centre s'avèrent de médiocres photosensibilisateurs, tout comme c'est le cas avec le Cu²⁺ et le Co²⁺ (ALI *et al.*, 1999). L'état photoexcité des porphyrines portant un cuivre en leur centre est extrêmement court, d'où la médiocre photosensibilisation. Le zinc augmente le temps de demi-vie de l'état triplet, d'où une meilleure génération d'oxygène singulet et donc plus de photosensibilisation (ALI *et al.*, 1999).

L'absence de métal ou la présence de zinc dans des porphyrines donnent généralement un effet photosensibilisateur (ALI *et al.*, 1999). Dans notre étude, pour la porphyrine sans brome, les dérivés avec zinc (**5**) ou sans métal (**2**) génèrent un effet photosensibilisateur à peu près égal. Quant aux dérivés de porphyrine avec des bromes en position *N*-allyl, la molécule sans métal (**3**) se démarque par un effet photosensibilisateur de loin supérieur à son analogue portant un zinc (**7**). Une autre étude réalisée avec des dérivés de porphyrine (méthyl pyrophéophorbide-*a*) corrobore l'observation que le dérivé sans métal est un photosensibilisateur plus efficace que le dérivé portant un zinc en son centre (CHEN *et al.*, 2005). Ces résultats s'expliqueraient par la capacité de l'atome central de zinc de diminuer la formation quantique d'oxygène singulet par des processus compétitifs non-radiatifs (MATHAI *et al.*, 2007). Une

expérience de chimie physique^{ix} a montré que la formation de complexes supramoléculaires avec le zinc au centre de porphyrines fluorées inhibait fortement la formation d'oxygène singulet (KASHIWAGI *et al.*, 2003). Le zinc peut accepter des ligands axiaux. En effet, des interactions entre les porphyrines face-à-face (Zn-Zn ou Zn-imidazole) ont été observées par cristallographie à rayons-X entre des porphyrines avec un Zn en leur centre. Ces interactions seraient accompagnées de transferts d'énergie (GROS *et al.*, 2007). Par conséquent, l'énergie peut être transférée aux ligands axiaux plutôt que d'être transférée à l'oxygène pour former l'oxygène singulet, ce qui expliquerait le rendement inférieur pour la génération d'oxygène singulet.

L'implication des atomes de zinc dans ces interactions intermoléculaires expliqueraient le déplacement vers le rouge observé en spectrophotométrie UV-visible pour les composés **5** et **7** par rapport à leur analogue sans métal central (KASHIWAGI *et al.*, 2003). Le déplacement vers le rouge a plus d'ampleur pour les composés sans bromes que pour les composés avec des bromes en position *N*-allyl. Les bromes pourraient peut-être causer un encombrement stérique qui nuirait un peu à ces interactions intermoléculaires.

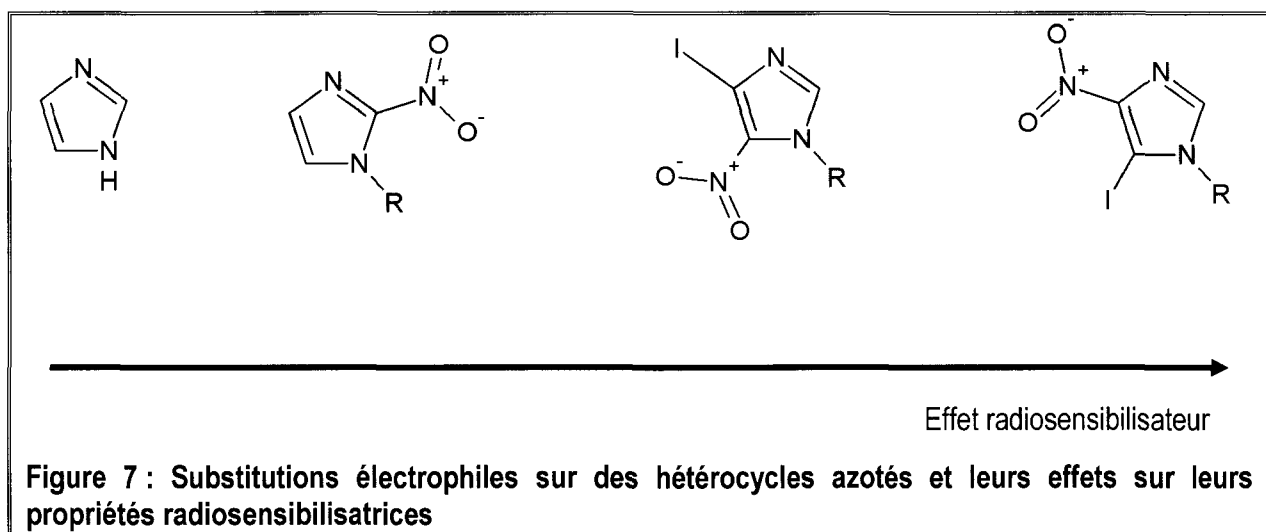
Ces résultats suggèrent que les porphyrines bromées en position *N*-allyl génèrent davantage d'oxygène singulet que les porphyrines sans brome. La présence du zinc dans le composé **7** diminuerait drastiquement la formation d'oxygène singulet par rapport au composé **3** : des interactions intermoléculaires avec le zinc expliqueraient cette compensation à la baisse de l'effet photosensibilisateur par rapport au composé **3** sans métal.

^{ix} Plus précisément, il s'agit d'une expérience de détection directe de la phosphorescence caractéristique suivant l'excitation polychromatique des porphyrines étudiées, portant différents métaux en leur centre ou aucun métal. Pour de plus amples détails sur le montage expérimental, consulter l'article (MATHAI *et al.*, 2007).

6.3. Comment les atomes de brome augmentent l'effet radiosensibilisateur

Un effet indirect des radiations, tel que décrit sur la figure 4, pourrait impliquer des espèces réactives issues de la radiolyse de l'eau. Dans un tel cas, les espèces réactives pourraient attaquer l'atome d'azote chargé en position *N*-allyl et générer le fragment 2,3-dibromopropène et contribuer à l'effet radiosensibilisant tel que décrit à la section 6.1.3. pour l'effet photosensibilisant.

L'ajout d'halogènes a permis d'augmenter l'effet radiosensibilisateur de molécules autres que les porphyrines. L'imidazole est une molécule simple qui n'est pas vraiment radiosensibilisatrice. Si on y ajoute un groupe nitro qui polarise les électrons du cycle, alors il est intéressant d'observer que les dérivés nitroimidazoles montrent un effet radiosensibilisateur. L'ajout d'un halogène sur un dérivé nitroimidazole augmente encore davantage les propriétés radiosensibilisatrices et l'effet dépend de la position de l'halogène (GUPTA *et al.*, 1985). Ces observations suggèrent que la déformation du nuage électronique d'un hétérocycle azoté par des groupes attracteurs d'électrons corrèle bien avec une augmentation des propriétés radiosensibilisatrices. La déformation du nuage électronique pourrait causer un effet similaire avec les porphyrines, qui sont elles aussi des hétérocycles azotés.



Des études de cinétique des électrons ont démontré que les groupements pyridinium peuvent servir de canal favorisant le passage des électrons π dans des porphyrines cationiques irradiées en solution (Grodkowski et al., 1984). Les porphyrines de la présente étude possèdent toutes 4 groupes pyridinium substitués. Les bromes en position N-allyl pourraient accentuer la canalisation des électrons π en raison de leur électronégativité. Ce phénomène contribuerait à déformer davantage le nuage électronique et accentuerait l'attraction électrophile vers l'extérieur de l'hétérocycle aromatique azoté du coeur des porphyrines. Les porphyrines avec des bromes en position N-allyl se sont avérées les meilleurs radiosensibilisateurs comparées aux autres dans la présente étude.

6.3.1. Mécanisme le plus probable : augmentation de la durée de la demi-vie d'un état excité des porphyrines, générant ainsi plus d'espèces réactives de l'oxygène

Les atomes de brome sont très électronégatifs: ils attirent les électrons délocalisés et peuvent contribuer à stabiliser plus longtemps un état excité de la molécule. L'ajout de bromes en position N-allyl permet davantage de formes de résonance possibles que les bromes en position β -pyrrole. Plus la demi-vie des porphyrines à l'état excité augmente, plus grande sera la probabilité d'interagir avec l'oxygène et de former des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Les espèces réactives de l'oxygène seraient les véritables effectrices de l'effet radiosensibilisateur, tel que décrit dans la figure 5 par l'effet indirect. Les ROS regroupent l'oxygène singulet et des radicaux libres tels l'anion superoxide, le peroxyde d'hydrogène, le radical hydroxyle et le peroxydinitrite. Les radicaux libres sont des espèces chimiques possédant un ou plusieurs électrons non paires. L'oxygène singulet n'est pas un radical libre.

La modulation des ROS pourrait s'avérer bénéfique pour traiter le cancer. Les ROS interviennent de façon très complexe dans la signalisation cellulaire des cellules cancéreuses ou favorisent la transformation de cellules normales en cellules malignes. Il existe deux principales approches opposées.

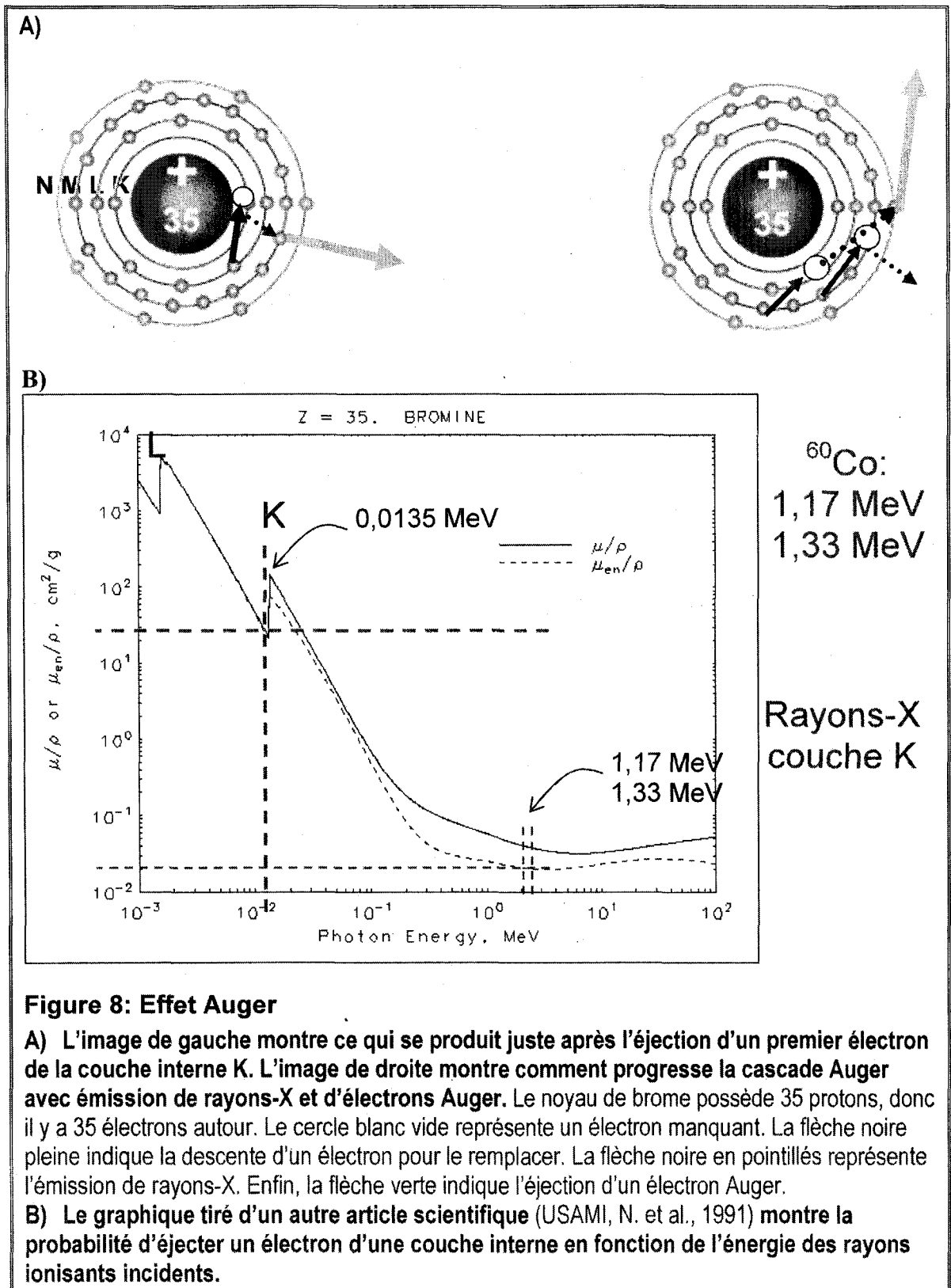
La première approche vise à augmenter la neutralisation (*scavenging*) des ROS, mais les essais cliniques se sont avérés peu concluants. La seconde approche vise au contraire à augmenter et/ou favoriser l'accumulation des ROS dans les cellules cancéreuses dans l'espoir d'y déclencher l'apoptose. Des concentrations élevées de ROS favorisent l'apoptose en provoquant l'ouverture des pores de transition perméabilisant les mitochondries et en relâchant des facteurs pro-apoptotiques (FRUEHAUF *et al.*, 2007). Il a été démontré que l'inhibition de la thiorédoxine pouvait causer la mort des cellules cancéreuses et que cette activité thérapeutique pouvait être augmentée par l'anion superoxide, un ROS. Le dérivé de porphyrine Motexafin gadolinium™ inhibe la thiorédoxine, mais en plus il convertit la thiorédoxine en un générateur de ROS. Ce dérivé de porphyrines s'est montré un radiosensibilisateur prometteur dans les essais cliniques jusqu'à présent (FRUEHAUF *et al.*, 2007). Il semble plausible que d'une façon similaire, les porphyrines de la présente étude augmentent les ROS dans les cellules cancéreuses pour causer la mort cellulaire.

Cette hypothèse expliquerait les résultats obtenus en suggérant cet ordre croissant relatif de demi-vie de l'état excité: bromes en position β -pyrrole \leq sans brome $<$ bromes en position *N*-allyl. Pour l'effet radiosensibilisant, l'augmentation de la durée de la demi-vie de l'état excité des porphyrines grâce aux bromes en position *N*-allyl semble la plus plausible, néanmoins il faudrait vérifier cette durée, identifier et quantifier les espèces réactives de l'oxygène dans d'autres expériences. Quant à l'effet photosensibilisateur, nos résultats (voir tableau 1 dans notre article) montrent que les porphyrines sans bromes génèrent davantage d'oxygène singulet que les porphyrines avec des bromes en position *N*-allyl, contrairement à ce qui était attendu. Le mécanisme d'action reste donc à élucider. D'autres expériences seront nécessaires pour répondre à des questions comme « Y a-t-il d'autres ROS impliqués? Si oui, lesquels?».

6.3.2. Cascade d'électrons Auger : hypothèse peu probable

Un mécanisme de radiosensibilisation résonant implique que des rayons ionisants éjectent un électron d'une couche interne d'un atome lourd, comme le brome. Le graphique de la figure 8 montre la probabilité de l'éjection d'un électron d'une couche interne du brome en fonction de l'énergie des rayons ionisants incidents. Les électrons des couches supérieures descendent pour remplacer l'électron manquant et l'excédent d'énergie est émis sous forme de rayons-X. Certains de ces rayons-X peuvent à leur tour éjecter d'autres électrons des couches internes. Il s'ensuit une cascade d'électrons Auger, au cours de laquelle plusieurs électrons sont éjectés et plusieurs rayons-X sont émis, éjectant d'autres électrons et ainsi de suite, tel qu'illustré sur la figure 8.

Bien qu'intéressant, le mécanisme de radiosensibilisation augmentée grâce à l'effet Auger semble très improbable dans le cas des porphyrines de cette étude. Tel que montré sur le graphique de la figure 8, les rayons ionisants incidents doivent posséder une énergie légèrement supérieure mais très proche de celle de la couche électronique visée pour qu'un électron d'une couche interne soit éjecté et que l'effet Auger contribue significativement à l'effet radiosensibilisateur (USAMI *et al.*, 1991). Les électrons de la couche K du brome possèdent une énergie de 13,47 keV, alors que la source de ⁶⁰Co utilisée pour irradier les cellules émet deux rayons gamma principaux possédant 1,17 et 1,33 MeV respectivement. À des énergies aussi élevées, un mécanisme résonant impliquant un effet Auger semble improbable.



6.4. Contribution du métal central à l'effet radiosensibilisateur

En milieu oxygène (cellules bien oxygénées), à des concentrations de porphyrines entre 50 à 100 μM , le cobalt et le zinc offriraient une légère radiosensibilisation selon la littérature (JAMES *et al.*, 1996); (O'HARA *et al.*, 1989). À une concentration de porphyrines de 1 μM dans la présente étude, aucune différence significative n'a pu être observée selon la présence et la nature du métal central. Néanmoins, aucun essai de radiosensibilisation n'a été effectué avec le cobalt dans la présente étude, alors son effet demeure inconnu avec les molécules étudiées ici.

7. Comparaison entre les méthodes de bromination

L'alkylation permet d'ajouter huit atomes de brome en position *N*-allyl sur des porphyrines cationiques. Tel que mentionné dans la discussion du mémoire de Jean-Philippe Tremblay-Morin (TREMBLAY-MORIN, 2005), la douceur des conditions d'alkylation présente d'énormes avantages de synthèse comparativement à la bromination avec du Br_2 . L'alkylation permet d'ajouter les bromes sur une molécule beaucoup plus simple que la porphyrine. La simplicité de la molécule tribromobropène simplifie la caractérisation en spectrométrie de masse, car la molécule ne porte que 2 atomes de bromes au lieu de 8. Puisque le brome se présente sous deux principaux isotopes, soit le ^{79}Br et le ^{81}Br , un atome de brome sur une molécule génère deux pics distincts en spectrométrie de masse. Deux atomes de brome génèrent 3 pics : ($2 \times 79 + M$; $2 \times 81 + M$; $79 + 81 + M$). Avec 8 atomes de brome sur une même molécule, les choses se compliquent et la détermination de la masse exacte devient très imprécise. Avec 8 atomes de brome sur une même molécule, le spectre de masse donnera en théorie 9 pics d'intensité différentes ($8 \times 79 + 0 \times 81 + M$; $7 \times 79 + 1 \times 81 + M$; $6 \times 79 + 2 \times 81 + M$; et ainsi de suite). Lorsque s'y ajoutent les incertitudes reliées à la fragmentation, à la perte d'un atome de métal central, les impuretés, la possibilité d'une bromination partielle, etc., l'analyse devient compliquée et ses résultats, moins fiables.

Bref, l'ajout de bromes sur une porphyrine par *N*-alkylation présente un avantage au niveau de la caractérisation par spectrométrie de masse. La stratégie d'alkylation permet aussi de simplifier la caractérisation par RMN¹H (résonance magnétique nucléaire des protons). En effet, le 1,2,3-tribromoprop-1-ène contient moins d'atomes d'hydrogènes que la porphyrine finale : l'analyse en est plus simple, car il y a moins de pics intégrés.

De surcroît, l'ajout de bromes par *N*-alkylation au lieu de la β -bromination avec du Br₂ présente des avantages au niveau de la stabilité des produits. La porphyrine à 8 bromes obtenue par *N*-alkylation demeure stable (≥ 3 mois en poudre à 4°C à l'abri de la lumière sous atmosphère d'air normal) beaucoup plus longtemps que la porphyrine à 8 bromes en position β (≤ 3 jours en poudre, même sous atmosphère inerte à l'argon à 4°C à l'abri de la lumière). Des produits ou intermédiaires de réactions plus stables signifient moins d'efforts et de temps pour répéter les synthèses ainsi que moins d'impuretés au fil du temps et moins de gaspillage. Le 1,2,3-tribromopropène synthétisé pour la *N*-alkylation demeure stable pendant plusieurs mois à -20°C sous forme d'huile dorée, à l'abri de la lumière sous atmosphère inerte. Le chimiste peut donc réutiliser un même lot de ce réactif plusieurs fois sans manipuler directement du Br₂, qui est beaucoup plus dangereux et toxique. De surcroît, une meilleure stabilité permet aussi de minimiser les efforts des pharmacologues ou biologistes chargés de tester les produits sur le vivant. En effet, pour un produit labile comme la porphyrine portant 8 bromes en position β , la synthèse, la solubilisation, la calibration, la stérilisation et toutes les autres étapes de préparation du produit doivent être répétées à chaque journée d'expériences. En contrepartie, une porphyrine stable pendant deux semaines en solution permet d'effectuer les expériences en série pendant deux semaines, ce qui minimise les pertes de temps. Enfin, la stabilité constitue un critère pratique indéniable pour l'applicabilité en clinique. Une porphyrine dont la stabilité se limite à 3 jours s'avère peu attrayante pour une compagnie pharmaceutique et peu pratique pour les cliniciens. Un si court délai manque de réalisme

pour la fabrication, le contrôle de la qualité, l'emballage, le transport, la distribution, la formulation en injectable stérile et enfin l'administration au patient. À défaut de trouver une formulation assurant une longévité raisonnable de ce produit, on le rejeterait. Quant à la porphyrine bromée par *N*-alkylation, sa stabilité permet d'envisager avec réalisme son utilisation en clinique.

Quant à la solubilité du produit, encore une fois les porphyrines bromées par *N*-alkylation présentent un net avantage comparativement aux porphyrines bromées en position β avec du Br_2 . Les atomes d'hydrogène à la position β possèdent un petit pK_a , c'est-à-dire un certain potentiel d'ionisation. Par conséquent, ces hydrogènes contribuent à leur solubilité dans l'eau et dans d'autres solvants polaires. La porphyrine bromée en position β perd de la solubilité dans l'eau, car elle a perdu ces atomes d'hydrogènes dans le macrocycle qui avaient tous un petit pK_a . De plus, son utilisation dans le vivant s'avère plus compliquée et requiert davantage de travail pour la formulation.

En ce qui concerne la purification du produit, encore une fois la porphyrine bromée par *N*-alkylation ressort gagnante. Premièrement, les rendements de bromination par *N*-alkylation surpassent 90 % et de façon reproductible, tandis que pour la β -bromination les rendements s'avèrent plus faibles (60 à 85%) et variables, car le Br_2 et le HBr formé attaquent la porphyrine. Deuxièmement, la porphyrine bromée par *N*-alkylation pouvait être purifiée par chromatographie liquide sur une colonne Septra SDB-L (255 Å, Phenomenex) avec des solvants polaires faciles à éliminer par évaporation rotative sous pression réduite à des températures n'excédant pas 60°C. Quant à la porphyrine ayant subi la β -bromination avec Br_2 , elle restait fixée dans la colonne et seul le DMF permettait de la récupérer que très partiellement. Le processus laborieux excède la durée de la stabilité du produit, même en poudre. Autre problème supplémentaire, le DMF s'évapore difficilement et nécessite beaucoup de chaleur : des températures supérieures à 60°C permettent aux bromes de s'éliminer de la molécule et par conséquent, le produit se

dégrade pendant son isolation. De plus, la cristallisation de cette porphyrine dans le DMF avec de l'éther à température ambiante s'est avérée peu efficace. Par conséquent, le seul moyen trouvé pour purifier la porphyrine bromée en position β avec du Br_2 dans du DMF consiste à la faire précipiter avec de l'eau pure sur un filtre sous vide et de rincer maintes fois avec de l'eau. Dans le but d'assécher le produit, le filtrage sous vide est maintenu pendant plusieurs minutes, puis la « pâte » de porphyrine est étendue en fine couche sur un papier à pesée afin d'aider l'eau à s'évaporer à température ambiante, à l'abri de la lumière. Les produits de dégradation restants et/ou de bromination partielle accompagnaient le produit désiré pour la caractérisation et les essais biologiques, faute de pouvoir mieux les séparer. Quant à la porphyrine bromée par *N*-alkylation, bien que brute elle affichait 5 pics au HPLC, sa caractérisation démontre qu'il ne s'agissait que d'isomères géométriques.

La purification a servi à isoler les deux produits correspondant aux 2 pics majeurs obtenus sur le chromatogramme. Il serait néanmoins possible d'obtenir un seul produit majeur si on utilisait un seul isomère (E ou Z) du 1,2,3-tribromopropène au lieu d'utiliser un mélange. La possibilité de purifier la porphyrine bromée par *N*-alkylation sur une colonne de chromatographie liquide Septra SDB-L (255 Å, Phenomenex) permet d'en retirer plus parfaitement l'excès de métal-acétate suite à la métallation. Cette étape empêche d'obtenir des résultats biologiques faussés par l'interaction d'un métal libre sur les cellules.

Finalement, la bromination par *N*-alkylation ouvre la porte facilement à de nombreuses possibilités de métaux centraux, alors que les restrictions imposées par la β -bromination en limitent le choix. En effet, les douces conditions de bromination par *N*-alkylation permettaient de brominer une porphyrine non-métallée sans la détruire. La porphyrine obtenue (3) demeurait sans métal central et par conséquent, ses bases libres pouvaient librement réagir avec la plupart des métaux divalents par la suite. La métallation

avec le cuivre acétate ou avec le zinc acétate fonctionnait à température ambiante, soit des conditions sans chauffage préservant l'intégrité des bromes sur la porphyrine. Par contre, les dures conditions de bromination avec le Br_2 détruisent les porphyrines non-métallées. Une métallation préalable avec le cuivre était nécessaire. Suite à la bromination (**10**), les tentatives de démétallation dans un acide très concentré (H_2SO_4 98%, TFA, HCl) se sont toutes soldées par un échec. Ces conditions acidiques intenses pourraient dégrader la porphyrine. Si la démétallation avait réussi avec un rendement raisonnable, un certain pourcentage de la porphyrine aurait quand même conservé le cuivre en son centre. La métallation subséquente avec un autre métal aurait produit un mélange de métalloporphyrines portant soit un cuivre, soit l'autre métal. Il serait pratiquement impossible de bien purifier et d'isoler séparément ces métalloporphyrines.

8. Localisation intracellulaire

A)

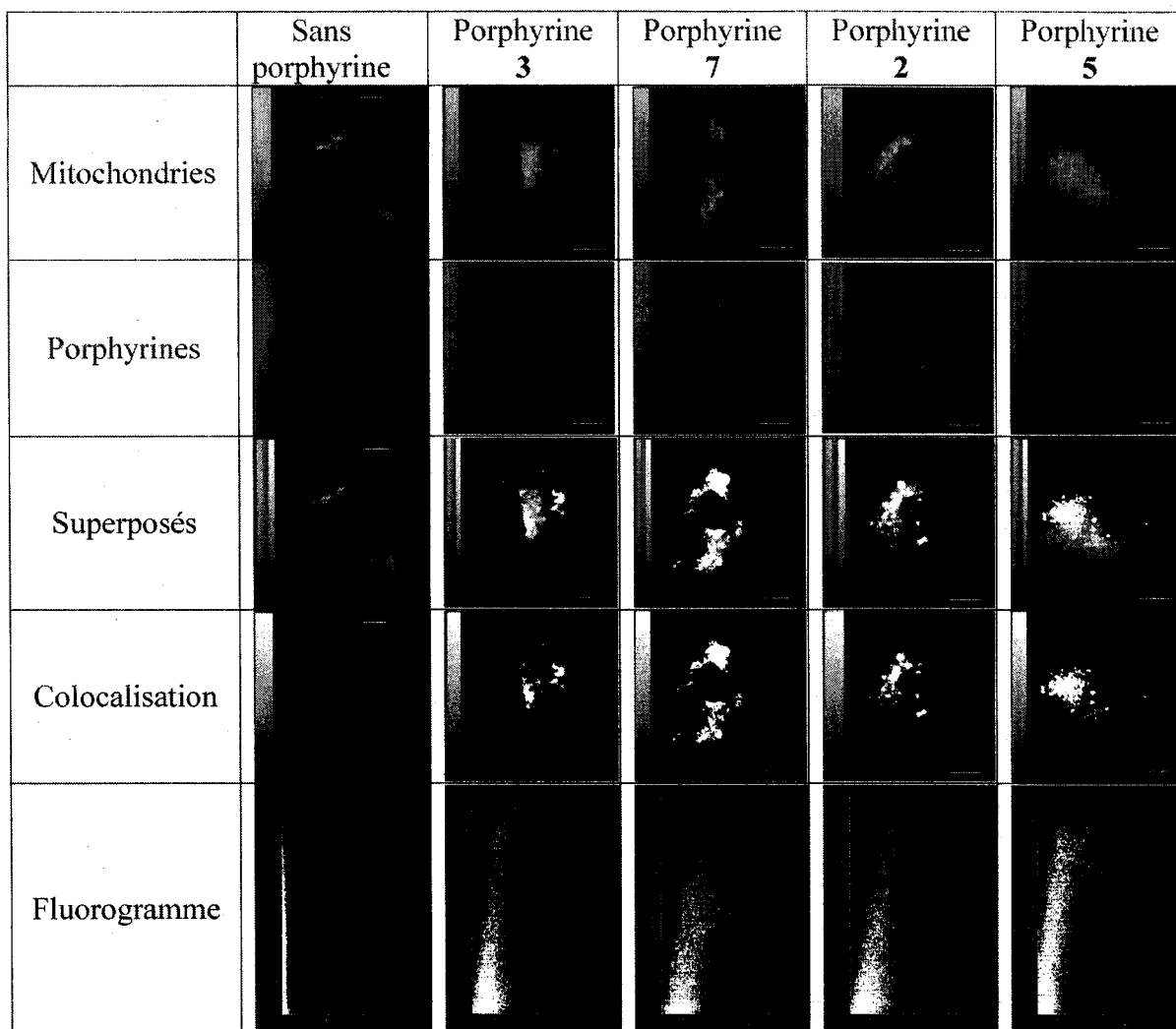


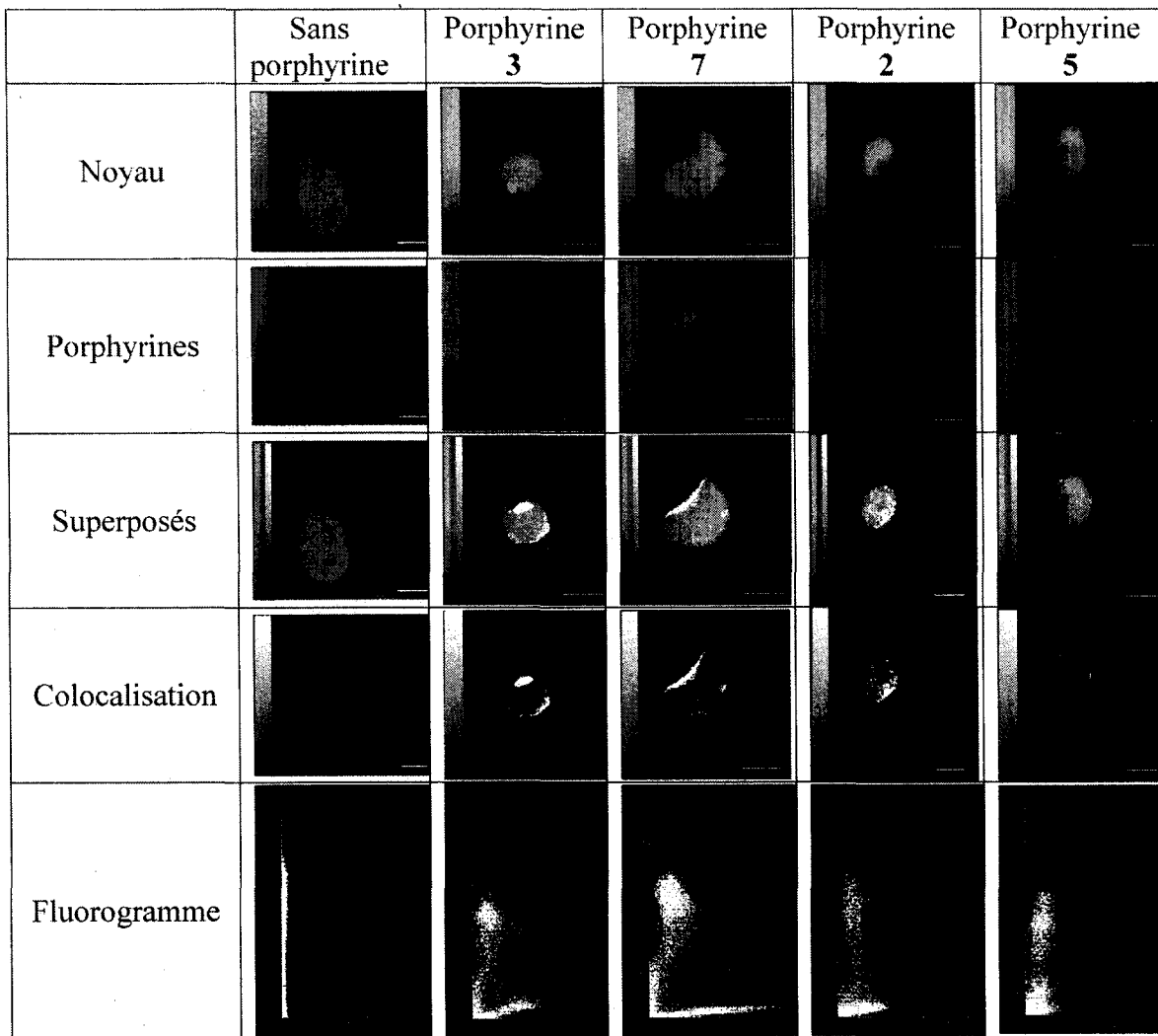
Figure 9: Résultats de la microscopie confocale à fluorescence

A) Ci-haut : Colocalisation des porphyrines dans le noyau cellulaire

B) Page suivante : Colocalisation des porphyrines dans les mitochondries

Le numéro des porphyrines réfère au schéma des synthèses chimiques dans l'article. Sur les fluorogrammes, l'intensité du signal rouge (porphyrines) est en abscisse et l'intensité du signal vert (noyau ou mitochondries) est en ordonnée. Les cellules MDA-MB-231 ont été incubées pendant 3 heures avec 1 μM de porphyrine. Ensuite, les cellules ont été incubées avec (A) le « Mitotracker green » pour colorer les mitochondries ou (B) le « Syto green » pour colorer les noyaux.

B)



Selon les résultats de colocalisation en microscopie confocale à fluorescence, les porphyrines étaient localisées principalement dans les mitochondries et aussi un peu au noyau. Il est intrigant d'observer que certaines mitochondries semblent avoir capturé beaucoup de porphyrines alors que d'autres n'en ont pas accumulé. La cause de cette hétérogénéité demeure obscure. Ces différences pourraient être reliées à un empilement des porphyrines une fois à l'intérieur des cellules, mais considérant leurs 4 charges positives, cela semble plutôt improbable. Ce phénomène pourrait être attribuable à des différences dans l'activité métabolique des mitochondries ou des différences dans l'expression de récepteurs et/ou de transporteurs ayant de l'affinité avec les porphyrines à l'étude. Les porphyrines ont aussi été observées

dans le noyau. Les fluorogrammes indiquent une corrélation inverse: plus l'ADN est compact et moins les porphyrines s'y accumulent. Cela suggère que les porphyrines s'intercalent dans les régions décompactées de la chromatine, probablement les régions transcriptionnellement actives.

9. Interactions moléculaires à explorer

« *Corpora non agunt nisi fixata* » Ce dicton de Paul Ehrlich^x résume les fondements de la pharmacologie : les corps n'agissent pas sans se lier. Afin d'optimiser le développement rationnel de radio- et photosensibilisateurs améliorés, il pourrait être utile de comprendre davantage les interactions moléculaires des porphyrines synthétisées pour la présente étude, en fonction des changements à leur structure chimique. Les résultats de microscopie confocale à fluorescence ont révélé la présence des porphyrines à l'étude surtout dans les mitochondries et un peu au noyau, sans toutefois préciser avec quelles molécules elles interagissent.

Tel que mentionné précédemment, des porphyrines cationiques peuvent se lier à de l'ADN en solution aqueuse, mais est-ce extrapolable dans une cellule cancéreuse métaboliquement active? Des études plus approfondies et élaborées en microscopie confocale à fluorescence pourraient peut-être répondre à cette question.

Est-ce qu'un ou des récepteurs est impliqué dans l'effet photo- et radiosensibilisateur? Si oui, quelle est l'affinité et la sélectivité des porphyrines pour ce récepteur? Il serait intéressant de faire des études de liaison avec les porphyrines cationiques synthétisées dans le présent ouvrage et de comparer avec

^x Paul Ehrlich (1854–1915) a remporté un Prix Nobel de physiologie et médecine en 1908 pour la découverte de la phagocytose. Paul Ehrlich fut un pionnier de la pharmacologie thérapeutique. Il a introduit les concepts de *récepteur* et de *chimiothérapie*, reliant la structure chimique d'une molécule à son activité pharmacologique. Un article lui est dédié en l'honneur du centenaire de son prix Nobel (BOSCH, 2008).

d'autres porphyrines et différents récepteurs d'intérêt exprimés à la membrane mitochondriale. Une autre approche pharmacologique intéressante consisterait à répéter les essais MTT et clonogéniques en incubant les cellules au préalable avec un antagoniste du ou des récepteurs d'intérêt et à observer ensuite si les effets photo- et radiosensibilisateurs changent. PBR (Peripheral Benzodiazepine Receptor) est un exemple de récepteur d'intérêt, c'est-à-dire un récepteur pour lequel des porphyrines ont une affinité relativement élevée selon la littérature (SNYDER *et al.*, 1987); (VERMA *et al.*, 1987); (VERMA *et al.*, 1988); (VERMA *et al.*, 1998). Les ligands de PBR à des concentrations nanomolaires peuvent induire l'apoptose à partir des mitochondries (AZARASHVILI *et al.*, 2007). Les récepteurs PBR sont situés à la membrane mitochondriale dans les cellules non-cancéreuses et assument les fonctions suivantes: transporteur des dérivés du cholestérol et régulateur de la stéroïdogénèse, de la respiration cellulaire et de l'apoptose. Dans des lignées cellulaires de cancers agressifs du sein, du foie et du cerveau, PBR est surexprimé à la membrane nucléaire pour transporter le cholestérol dans le noyau et réguler la prolifération cellulaire (LI *et al.*, 2001). La lignée cellulaire de carcinome mammaire humain MDA-MB-231, la même que celle utilisée dans le présent ouvrage, surexprime le récepteur PBR et est considérée comme une lignée cellulaire de cancer agressif. Lorsque l'expression de PBR y est réduite de 50% grâce à l'infection par un lentivirus contenant un siARN, la concentration des protéines suivantes augmente significativement dans les cellules : p21, cycline A, caspase-3 clivée (activée) et p53. Conséquemment, les cellules MDA-MB-231 infectées avec une expression réduite de PBR restent davantage dans la phase G₁ du cycle cellulaire et prolifèrent beaucoup plus lentement que les cellules MDA-MB-231 exprimant fortement PBR (LI *et al.*, 2007).

De surcroît, l'oxygène singulet réagit avec le cholestérol pour produire des dérivés oxydés du cholestérol qui s'avèrent de puissants inhibiteurs de la synthèse des stérols et régulent l'expression de plusieurs gènes (BJORKHEM, 2002). D'une part, la monographie du Photofrin II avertit les usagers que les

hormones stéroïdiennes administrées après la thérapie photodynamique diminuent l'efficacité du Photofrin™. D'autre part, d'autres hormones stéroïdiennes comme le 2-méthoxyoestradiol, augmentent synergiquement les effets anti-tumoraux de la thérapie photodynamique (GOLAB *et al.*, 2003). Ces indices suggèrent une interaction entre les stéroïdes et les porphyrines : il serait intéressant d'investiguer sur les interactions des porphyrines.

D'autres métaux comme le nickel et l'indium pourraient être insérés dans le centre des porphyrines : dans un autre dérivé de porphyrine, ces métaux augmentaient à la fois son affinité pour les récepteurs PBR et son efficacité à générer l'oxygène singulet en thérapie photodynamique (CHEN *et al.*, 2005).

Conclusions

- 1) À une concentration de 1 μM des porphyrines de la présente étude, l'influence du métal central :
 - a) négligeable sur l'effet radiosensibilisateur;
 - b) l'absence de métal donne les meilleurs photosensibilisateurs, suivie du zinc, alors que pour le cuivre l'effet photosensibilisateur est nul.
- 2) À une concentration de 1 μM des porphyrines de la présente étude, l'influence des bromes et de leur position :
 - a) les bromes en position *N*-allyl offrent la meilleure augmentation de radiosensibilisation;
 - b) les bromes en position *N*-allyl offrent la meilleure augmentation de photosensibilisation.
- 3) Le mécanisme d'action reste à confirmer. L'hypothèse qui semble la plus plausible postule que les bromes à cette position favorisent une augmentation de la durée de demi-vie de l'état excité de la porphyrine et donc une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (oxygène singulet et/ou autres).

Remerciements

Les membres du jury qui ont accepté de réviser et m'aider à perfectionner mon mémoire :

- Johannes van Lier Ph.D.
- Benoit Paquette Ph.D.
- Darel Hunting Ph.D.
- Gilles Dupuis Ph.D.

Mes codirecteurs :

- Johannes van Lier Ph.D.
- Benoit Paquette Ph.D.

Mes collègues de laboratoire dont l'aide et le soutien furent très précieux:

- Hasrat Ali Ph.D.
- Hélène Therriault B.Sc.
- Rosalie Lemay étudiante Ph.D.
- Nicole Cauchon Ph.D.
- Gabriel Charest étudiant Ph.D.
- Réjean Langlois M.Sc.
- Guillaume Garcia Ph.D.
- Jean-Philippe Tremblay-Morin étudiant Ph.D.

Toutes ces autres personnes fantastiques et professionnelles avec qui j'ai eu la chance de travailler ou de discuter de mon projet:

- Peggy Regulus Ph.D.
- Martin Lepage Ph.D.
- Luc Tremblay Ph.D.
- Claude Pépin Ph.D.
- Darel Hunting Ph.D.
- Brigitte Guérin Ph.D.

- Christine Lavoie, Ph.D.
- Marie-Claude Tremblay M.Sc.
- Serge Rodrigue, technicien au cyclotron
- Ridthee Meesat étudiant Ph.D.
- Daniel Robillard, soutien informatique
- Jean-Paul Jay-Gérin Ph.D.
- Roger Lecomte Ph.D.
- Jacques Rousseau Ph.D.
- Mélanie Archambault, technicienne en santé animale
- Beata Anna Jastrzebska Ph.D.
- Pierre-Jean Debouttière Ph.D.
- Émilie Brun étudiante Ph.D.
- Jean-Sébastien Binette, stagiaire chimiste (aide en RMN)

Mon conjoint, Jérôme Faucher, qui m'a soutenue et encouragée tout au long de mes études malgré les sacrifices personnels impliqués, incluant la monopolisation de son ordinateur.

L'équipe de concierges sympathiques du soir, qui me tenaient un peu compagnie pour les longues soirées au labo !!!

Mes ami(e)s, en particulier l'incroyablement dévouée Mélanie Boucher-Lavallée qui m'a aidée à relire et réviser mon mémoire ainsi que mon dernier séminaire.

Je vous aime et je vous apprécie!

Liste des références

- Abend, M. (2003). Reasons to reconsider the significance of apoptosis for cancer therapy. *International journal of radiation biology*, vol. 79, n° 12, p. 927-941.
- Agence de Santé Publique Canada. (2004) *Principales causes de décès et d'hospitalisation au Canada*. [En ligne]. <http://www.phac-aspc.gc.ca/publicat/lcd-pcd97/table1-fra.php> (Page consultée le 17 mai 2008).
- Ahmad, N. et Mukhtar, H. (2000). Mechanism of photodynamic therapy-induced cell death. In Lester Packer and Helmut Sies, *Methods in Enzymology*, (p. 342-358). Academic Press.
- Ali, H. et van Lier, J.E. (1999). Metal complexes as photo- and radiosensitizers. *Chemical reviews*, vol. 99, n° 9, p. 2379-2450.
- Allison, R.R., Downie, G.H., Cuenca, R., Hu, X.H., Childs, C.J.H. et Sibata, C.H. (2004). Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 1, p. 27-42.
- Ara, G., Aprille, J.R., Malis, C.D., Kane, S.B., Cincotta, L., Foley, J., Bonventre, J.V. et Oseroff, A.R. (1987). Mechanisms of mitochondrial photosensitization by the cationic dye, N,N-bis(2-ethyl-1,3-dioxylene)kryptocyanine (EDKC): preferential inactivation of complex I in the electron transport chain. *Cancer research*, vol. 47, n° 24 Pt 1, p. 6580-6585.
- Azarashvili, T., Grachev, D., Krestinina, O., Evtodienko, Y., Yurkov, I., Papadopoulos, V. et Reiser, G. (2007). The peripheral-type benzodiazepine receptor is involved in control of Ca²⁺-induced permeability transition pore opening in rat brain mitochondria. *Cell calcium*, vol. 42, n° 1, p. 27-39.
- Babilas, P., Schacht, V., Liebsch, G., Wolfbeis, O.S., Landthaler, M., Szeimies, R.M. et Abels, C. (2003). Effects of light fractionation and different fluence rates on photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid in vivo. *British journal of cancer*, vol. 88, n° 9, p. 1462-1469.
- Babincova, M., Sourivong, P. et Babinec, P. (2000). Gene transfer-mediated intracellular photodynamic therapy. *Medical hypotheses*, vol. 54, n° 2, p. 180-181.
- Bellavance, M.A., Blanchette, M. et Fortin, D. (2008). Recent advances in blood-brain barrier disruption as a CNS delivery strategy. *The AAPS journal*, vol. 10, n° 1, p. 166-177.
- Bensasson, R.V., Land, E.J. et Truscott, T.G. (1993). *Excited States and Free Radicals in Biology and Medicine: Contributions from Flash Photolysis and Pulse Radiolysis*. Oxford, Oxford Univ Pr, 431 p.

- Ben Younes A, Maiuri MC, Lavandero S, Kroemer G, Vicini, F.A., Remouchamps, V., Wallace, M., Sharpe, M., Fayad, J., Tyburski, L., Letts, N., Kestin, L., Edmundson, G., Pettinga, J., Goldstein, N.S. et Wong, J. (2003). Ongoing clinical experience utilizing 3D conformal external beam radiotherapy to deliver partial-breast irradiation in patients with early-stage breast cancer treated with breast-conserving therapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, vol. 57, n° 5, p. 1247-1253.
- Bjorkhem, I. (2002). Do oxysterols control cholesterol homeostasis? *The Journal of clinical investigation*, vol. 110, n° 6, p. 725-730.
- Bonnett, R. (1995). Photosensitizers of the porphyrin and phtalocyanine series for photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews*, vol. 24, p. 19-33.
- Bosch F, Rosich L. (2008) The contributions of Paul Ehrlich to pharmacology: a tribute on the occasion of the centenary of his Nobel Prize. *Pharmacology*, vol. 82, n° 3, p.171-179.
- Brunner, T.B., Hahn, S.M., Gupta, A.K., Muschel, R.J., McKenna, W.G. et Bernhard, E.J. (2003). Farnesyltransferase inhibitors: an overview of the results of preclinical and clinical investigations. *Cancer research*, vol. 63, n° 18, p. 5656-5668.
- Busch, T.M., Wileyto, E.P., Emanuele, M.J., Del Piero, F., Marconato, L., Glatstein, E. et Koch, C.J. (2002). Photodynamic therapy creates fluence rate-dependent gradients in the intratumoral spatial distribution of oxygen. *Cancer research*, vol. 62, n° 24, p. 7273-7279.
- Cadet, J., Delatour, T., Douki, T., Gasparutto, D., Pouget, J.P., Ravanat, J.L. et Sauvaigo, S. (1999). Hydroxyl radicals and DNA base damage. *Mutation research*, vol. 424, n° 1-2, p. 9-21.
- Calzavara-Pinton, P.G., Venturini, M. et Sala, R. (2007). Photodynamic therapy: update 2006. Part 1: Photochemistry and photobiology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*, vol. 21, n° 3, p. 293-302.
- Castano, A.P.D., T.N. et Hamblin, M.R. (2004). Mechanisms in photodynamic therapy: part one - photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 1, p. 279-293.
- Cecchini, S., Girouard, S., Huels, M.A., Sanche, L. et Hunting, D.J. (2004). Single-strand-specific radiosensitization of DNA by bromodeoxyuridine. *Radiation research*, vol. 162, n° 6, p. 604-615.
- Cecchini, S., Girouard, S., Huels, M.A., Sanche, L. et Hunting, D.J. (2005). Interstrand cross-links: a new type of gamma-ray damage in bromodeoxyuridine-substituted DNA. *Biochemistry*, vol. 44, n° 6, p. 1932-1940.
- Chabner, B.A., Ryan, D.P., Paz-Ares, L., Garcia-Carbonero, R. et Calabresi, P. (2001). Antineoplastic Agents. In Hardman, J.G., Limbird, L.E. et Goodman Gilman, A., *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (p. 1389-1459). McGraw-Hill.

- Chan, W.H., Yu, J.S. et Yang, S.D. (2000). Apoptotic signalling cascade in photosensitized human epidermal carcinoma A431 cells: involvement of singlet oxygen, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3 and p21-activated kinase 2. *The Biochemical journal*, vol. 351, n° Pt 1, p. 221-232.
- Chapman, J.D., Reuvers, A.P., Borsa, J. et Greenstock, C.L. (1973). Chemical radioprotection and radiosensitization of mammalian cells growing in vitro. *Radiation research*, vol. 56, n° 2, p. 291-306.
- Chen, Y., Zheng, X., Dobhal, M.P., Gryshuk, A., Morgan, J., Dougherty, T.J., Oseroff, A., Pandey, R.K. (2005) Methyl pyropheophorbide-a analogues: potential fluorescent probes for the peripheral-type benzodiazepine receptor. Effect of central metal in photosensitizing efficacy. *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 48, n° 11, p. 3692-3695.
- Costantini, P., Jacotot, E., Decaudin, D. et Kroemer, G. (2000). Mitochondrion as a novel target of anticancer chemotherapy. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 92, n° 13, p. 1042-1053.
- Cury, F.L., Shenouda, G., Souhami, L., Duclos, M., Faria, S.L., David, M., Verhaegen, F., Corns, R. et Falco, T. (2006). Ultrasound-based image guided radiotherapy for prostate cancer: comparison of cross-modality and intramodality methods for daily localization during external beam radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, vol. 66, n° 5, p. 1562-1567.
- Cuzick, J., Stewart, H., Rutqvist, L., Houghton, J., Edwards, R., Redmond, C., Peto, R., Baum, M., Fisher, B. et Host, H. (1994). Cause-specific mortality in long-term survivors of breast cancer who participated in trials of radiotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, vol. 12, n° 3, p. 447-453.
- Dabrowski, J.M., Pereira, M.M., Arnaut, L.G., Monteiro, C.J., Peixoto, A.F., Karocki, A., Urbanska, K. et Stochel, G. (2007). Synthesis, photophysical studies and anticancer activity of a new halogenated water-soluble porphyrin. *Photochemistry and photobiology*, vol. 83, n° 4, p. 897-903.
- Dale, M.J., Costello, K.F., Jones, A.C. et Langridge-Smith, P.R. (1996). Investigation of porphyrins and metalloporphyrins using two-step laser mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry : JMS*, vol. 31, n° 6, p. 590-601.
- Daub, M.E., Herrero, S. et Chung, K.R. (2005). Photoactivated perylenequinone toxins in fungal pathogenesis of plants. *FEMS microbiology letters*, vol. 252, n° 2, p. 197-206.
- Dellinger, M. (1996). Apoptosis or necrosis following Photofrin photosensitization: influence of the incubation protocol. *Photochemistry and photobiology*, vol. 64, n° 1, p. 182-187.
- Derycke, A.S. et De Witte, P.A. (2002). Transferrin-mediated targeting of hypericin embedded in sterically stabilized PEG-liposomes. *International journal of oncology*, vol. 20, n° 1, p. 181-187.

- Detty, M.R., Gibson, S.L. et Wagner, S.J. (2004). Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Journal of medicinal chemistry*, vol. 47, n° 16, p. 3897-3915.
- Dewey, W.C., Ling, C.C. et Meyn, R.E. (1995). Radiation-induced apoptosis: relevance to radiotherapy. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, vol. 33, n° 4, p. 781-796.
- Diwu, Z. et Lown, J.W. (1994). Phototherapeutic potential of alternative photosensitizers to porphyrins. *Pharmacology & therapeutics*, vol. 63, n° 1, p. 1-35.
- Dougherty, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., Moan, J. et Peng, Q. (1998). Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 90, n° 12, p. 889-905.
- D'Souza, F., Villard, A., Van Caemelbecke, E., Franzen, M., Boschi, T., Tagliatesta, P. et Kadish, K.M. (1993). Electrochemical and spectroelectrochemical behavior of cobalt(III), cobalt(II), and cobalt(I) complexes of meso-tetraphenylporphyrinate bearing bromides on the .beta.-pyrrole positions. *Inorganic Chemistry*, vol. 32, n° 19, p. 4042-4048.
- Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. (1998). Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet*, vol. 351, n° 9114, p. 1451-1467.
- Elmore, S. (2007) Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, vol. 35, n° 4, p. 495-516.
- Engelmann, F.M., Mayer, I., Gabrielli, D.S., Toma, H.E., Kowaltowski, A.J., Araki, K. et Baptista, M.S. (2007). Interaction of cationic meso-porphyrins with liposomes, mitochondria and erythrocytes. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, vol. 39, n° 2, p. 175-185.
- Fabris, C., Valduga, G., Miotto, G., Borsetto, L., Jori, G., Garbisa, S. et Reddi, E. (2001). Photosensitization with zinc (II) phtalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer research*, vol. 61, n° 20, p. 7495-7500.
- Favaudon, V. (2000). Regulation of cell cycle and radiation-induced cell death. *Cancer radiothérapie : journal de la Société française de radiothérapie oncologique*, vol. 4, n° 5, p. 355-368.
- Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. (2000). *Lancet*, vol. 355, n° 9217, p. 1757-1770.
- Ferri, K.F. et Kroemer, G. (2001). Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nature cell biology*, vol. 3, n° 11, p. E255-E263.
- Firnao, G., Maass, D., Wilson, B.C. et Jeeves, W.P. (1984). ⁶⁴Cu labelling of hematoporphyrin derivative for non-invasive in-vivo measurements of tumour uptake. *Progress in clinical and biological research*, vol. 170, p. 629-636.

- Franken, N.A., Rodermond, H.M., Stap, J., Haveman, J. et van Bree, C. (2006). Clonogenic assay of cells in vitro. *Nature protocols*, vol. 1, n° 5, p. 2315-2319.
- Frazier, R.C., Vicini, F.A., Sharpe, M.B., Yan, D., Fayad, J., Baglan, K.L., Kestin, L.L., Remouchamps, V.M., Martinez, A.A. et Wong, J.W. (2004). Impact of breathing motion on whole breast radiotherapy: a dosimetric analysis using active breathing control. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, vol. 58, n° 4, p. 1041-1047.
- Fruehauf, J.P. et Meyskens, F.L., Jr (2007). Reactive oxygen species: a breath of life or death? *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 13, n° 3, p. 789-794.
- Fuller, S.J., Sivarajah, K. et Sugden, P.H. (2008). ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 44, n° 5, p. 831-854.
- Galbraith RA, Sassa S, Kappas A. (1985) Heme binding to murine erythroleukemia cells. Evidence for a heme receptor. *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 260, n° 22, p. 12198-12202.
- Gerlier, D. et Thomasset, N. (1986). Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *Journal of immunological methods*, vol. 94, n° 1-2, p. 57-63.
- Giovannetti, E., Mey, V., Loni, L., Nannizzi, S., Barsanti, G., Savarino, G., Ricciardi, S., Del Tacca, M. et Danesi, R. (2007). Cytotoxic activity of gemcitabine and correlation with expression profile of drug-related genes in human lymphoid cells. *Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society*, vol. 55, n° 4, p. 343-349.
- Godar, D.E. (2000). Singlet oxygen-triggered immediate preprogrammed apoptosis. In Lester Packer and Helmut Sies, *Methods in Enzymology*, (p. 309-330). Academic Press.
- Golab, J., Nowis, D., Skrzycki, M., Czczot, H., Baranczyk-Kuzma, A., Wilczynski, G.M., Makowski, M., Mroz, P., Kozar, K., Kaminski, R., Jalili, A., Kopec', M., Grzela, T. et Jakobisiak, M. (2003). Antitumor effects of photodynamic therapy are potentiated by 2-methoxyestradiol. A superoxide dismutase inhibitor. *The Journal of biological chemistry*, vol. 278, n° 1, p. 407-414.
- Gomer, C.J., Doiron, D.R., Rucker, N., Razum, N.J. et Fountain, S.W. (1984). Action spectrum (620-640 nm) for hematoporphyrin derivative induced cell killing. *Photochemistry and photobiology*, vol. 39, n° 3, p. 365-368.
- Gräsbeck R, Kouvonon I, Lundberg M, Tenhunen R. (1979) An intestinal receptor for heme. *Scandinavian Journal of Haematology*, vol. 23, n° 1, p. 5-9.
- Griffiths, J., Cruse-Sawyer, J., Wood, S.R., Schofield, J., Brown, S.B. et Dixon, B. (1994). On the photodynamic therapy action spectrum of zinc phthalocyanine tetrasulphonic acid in vivo. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, vol. 24, n° 3, p. 195-199.

- Grodkowski, J., Chambers, J.H. et Neta, P. (1984). Kinetics of electron transfer from cobalt(II) porphyrins to various metalloporphyrin .pi.-radical cations in irradiated carbon tetrachloride solutions. *Journal of Physical Chemistry*, vol. 88, n° 22, p. 5332-5333.
- Gros, C.P., Brisach, F., Meristoudi, A., Espinosa, E., Guillard, R. et Harvey, P.D. (2007). Modulation of the singlet-singlet through-space energy transfer rates in cofacial bisporphyrin and porphyrin-corrole dyads. *Inorganic chemistry*, vol. 46, n° 1, p. 125-135.
- Guo, M., Chen, C., Vidair, C., Marino, S., Dewey, W.C. et Ling, C.C. (1997). Characterization of radiation-induced apoptosis in rodent cell lines. *Radiation research*, vol. 147, n° 3, p. 295-303.
- Gupta, R.P., Larroquette, C.A., Agrawal, K.C., Grodkowski, J. et Neta, P. (1985). Potential radiosensitizing agents. 7. 4(5)-Iodo-5(4)-nitroimidazole derivatives. *Journal of medicinal chemistry*, vol. 28, n° 8, p. 987-991.
- Hall, E.J. (2000). *Radiobiology for the Radiologist*. 5th édition, Lippincott Williams & Wilkins, 588 p.
- Heidelberger C, Griesbach L, Cruz O, Schnitzer RJ, Grunberg E. Fluorinated pyrimidines. (1958) VI. Effects of 5-fluorouridine and 5-fluoro-2'-deoxyuridine on transplanted tumors. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. vol. 97, p. 470-475.
- Henderson, B.W., Busch, T.M. et Snyder, J.W. (2006). Fluence rate as a modulator of PDT mechanisms. *Lasers in surgery and medicine*, vol. 38, n° 5, p. 489-493.
- Henderson, B.W., Busch, T.M., Vaughan, L.A., Frawley, N.P., Babich, D., Sosa, T.A., Zollo, J.D., Dee, A.S., Cooper, M.T., Bellnier, D.A., Greco, W.R. et Oseroff, A.R. (2000). Photofrin photodynamic therapy can significantly deplete or preserve oxygenation in human basal cell carcinomas during treatment, depending on fluence rate. *Cancer research*, vol. 60, n° 3, p. 525-529.
- Hennequin C, Quero L, Favaudon V. (2008) Déterminants et facteurs prédictifs pour la radiosensibilité tumorale. *Cancer/Radiothérapie*, vol. 12, n° 1, p. 3-13.
- Hermann, R.M., Rave-Frank, M. et Pradier, O. (2008). Combining radiation with oxaliplatin: a review of experimental results. *Cancer radiothérapie : journal de la Société française de radiothérapie oncologique*, vol. 12, n° 1, p. 61-67.
- Hirakawa, K., Kawanishi, S., Hirano, T. et Segawa, H. (2007). Guanine-specific DNA oxidation photosensitized by the tetraphenylporphyrin phosphorus(V) complex via singlet oxygen generation and electron transfer. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, vol. 87, n° 3, p. 209-217.
- Hiraoka, M., Mitsumori, M. et Kokubo, M. (1997). The Roles and Controversies of Radiation Therapy in Breast Conserving Therapy for Breast Cancer. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*, vol. 4, n° 3, p. 127-133.

- Hirsch, T., Marchetti, P., Susin, S.A., Dallaporta, B., Zamzami, N., Marzo, I., Geuskens, M. et Kroemer, G. (1997) The apoptosis-necrosis paradox. Apoptogenic proteases activated after mitochondrial permeability transition determine the mode of cell death. *Oncogene*, vol. 15, n° 13, p. 1573-1581.
- Hoving, S., Heeneman, S., Gijbels, M.J., te Poele, J.A., Russell, N.S., Daemen, M.J. et Stewart, F.A. (2008). Single-dose and fractionated irradiation promote initiation and progression of atherosclerosis and induce an inflammatory plaque phenotype in ApoE(-/-) mice. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, vol. 71, n° 3, p. 848-857.
- Hsieh, Y.J., Wu, C.C., Chang, C.J. et 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. *Journal of cellular physiology*, vol. 194, n° 3, p. 363-375.
- Huang, Z. (2005). A review of progress in clinical photodynamic therapy. *Technology in cancer research & treatment*, vol. 4, n° 3, p. 283-293.
- Ikawa Y, Moriyama S, Harada H, Furuta H. (2008) Acid-base properties and DNA-binding of water soluble N-confused porphyrins with cationic side-arms. *Organic & Biomolecular Chemistry*, vol. 6, n°22, p. 4157-4166.
- Inada, N.M., da Silva, A.R., Jorge, R.A., Borecky, J. et Vercesi, A.E. (2007). Irradiated cationic mesoporphyrin induces larger damage to isolated rat liver mitochondria than the anionic form. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 457, n° 2, p. 217-224.
- Ishikawa, Y., Yamashita, T., Tomisugi, Y. et Uno, T. (2001). Interaction of porphyrins bearing peripheral cationic heterocycles with G-quadruplex DNA. *Nucleic acids research. Supplement (2001)*, vol. (1), n° 1, p. 107-108.
- Iwai, Y., Yamanaka, K. et Yasui, T. (2008). Boost radiosurgery for treatment of brain metastases after surgical resections. *Surgical neurology*, vol. 69, n° 2, p. 181-186.
- James, B.R., Meng, G.G., Posakony, J.J., Ravensbergen, J.A., Ware, C.J. et Skov, K.A. (1996). Porphyrins and metalloporphyrins: potential hypoxic agents. *Metal-based drugs*, vol. 3, n° 2, p. 85-89.
- Jawahar, A., Willis, B.K., Smith, D.R., Ampil, F., Datta, R. et Nanda, A. (2002). Gamma knife radiosurgery for brain metastases: do patients benefit from adjuvant external-beam radiotherapy? An 18-month comparative analysis. *Stereotactic and functional neurosurgery*, vol. 79, n° 3-4, p. 262-271.
- Jonathan, E.C., Bernhard, E.J. et McKenna, W.G. (1999). How does radiation kill cells? *Current opinion in chemical biology*, vol. 3, n° 1, p. 77-83.
- Joshi, P.C. (1998). Copper(II) as an efficient scavenger of singlet molecular oxygen. *Indian journal of biochemistry & biophysics*, vol. 35, n° 4, p. 208-215.

- Juzeniene, A., Peng, Q. et Moan, J. (2007). Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, vol. 6, n° 12, p. 1234-1245.
- Kaliski, A., Maggiorella, L., Cengel, K.A., Mathe, D., Rouffiac, V., Opolon, P., Lassau, N., Bourhis, J. et Deutsch, E. (2005). Angiogenesis and tumor growth inhibition by a matrix metalloproteinase inhibitor targeting radiation-induced invasion. *Molecular cancer therapeutics*, vol. 4, n° 11, p. 1717-1728.
- Kashiwagi, Y., Imahori, H., Araki, Y., Ito, O., Yamada, K., Sakata, Y. et Fukuzumi, S. (2003). Strong inhibition of singlet oxygen sensitization in pyridylferrocene-fluorinated zinc porphyrin supramolecular complexes. *Journal of physical chemistry. A, molecules, spectroscopy, kinetics, environment & general theory*, vol. 107, n° 29, p. 5515-5522.
- Kleinberg, L., Gibson, M.K. et Forastiere, A.A. (2007). Chemoradiotherapy for localized esophageal cancer: regimen selection and molecular mechanisms of radiosensitization. *Nature clinical practice.Oncology*, vol. 4, n° 5, p. 282-294.
- Ko, Y.J., Yun, K.J., Kang, M.S., Park, J., Lee, K.T., Park, S.B. et Shin, J.H. (2007). Synthesis and in vitro photodynamic activities of water-soluble fluorinated tetrapyridylporphyrins as tumor photosensitizers. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, vol. 17, n° 10, p. 2789-2794.
- Kollias, N. (1995). The spectroscopy of human melanin pigmentation, "Melanin: Its Role in Human Photoprotection". (p. 31-38). Valdenmar Publishing Co.
- Krishnamurthy, P., et Schuetz, J. D. (2006). Role of ABCG2/BCRP in biology and medicine. *Annual Review of Pharmacology & Toxicology*, vol. 46, p. 381-410.
- Krishnamurthy P, Xie T, Schuetz JD. (2007) The role of transporters in cellular heme and porphyrin homeostasis. *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 114, n° 3, p. 345-358.
- Kroemer, G., Zamzami, N. et Susin, S.A. (1997) Mitochondrial control of apoptosis. *Immuno Today*, vol.18, n° 1, p. 44-51.
- Kulka, U., Schaffer, M., Siefert, A., Schaffer, P.M., Ölsner, A., Kasseb, K., Hofstetter, A., Dühmke, E. et Jori, G. (2003). Photofrin as a radiosensitizer in an in vitro cell survival assay. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 311, n° 1, p. 98-103.
- Kvols, L.K. (2005). Radiation sensitizers: a selective review of molecules targeting DNA and non-DNA targets. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*, vol. 46 Suppl 1, p. 187S-190S.
- Lacerda, S.H., Abraham, B., Stringfellow, T.C. et Indig, G.L. (2005). Photophysical, photochemical, and tumor-selectivity properties of bromine derivatives of rhodamine-123. *Photochemistry and photobiology*, vol. 81, n° 6, p. 1430-1438.
- Lane, N. (2003). New light on medicine. *Scientific American*, vol. 288, n° 1, p. 38-45.

- Lemay, R. (2008). *Développement de nouveaux radiosensibilisateurs bromés pour la thérapie des cellules cancéreuses du sein*. Mémoire M.Sc., Université de Sherbrooke, Bibliothèque nationale et archives Canada, Ottawa.
- Lemay, R., Archambault, M., Tremblay, L., Pépin, C., Lepage, M. et Paquette, B. (submitted). Irradiation of normal mouse tissue increases the invasiveness of mammary cancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biology*Physics*
- Lewis, G.N. (1926). The conservation of photons. *Nature*, vol. 118, n° 2981, p. 874-875.
- Li, H., Yao, Z., Degenhardt, B., Teper, G. et Papadopoulos, V. (2001). Cholesterol binding at the cholesterol recognition/ interaction amino acid consensus (CRAC) of the peripheral-type benzodiazepine receptor and inhibition of steroidogenesis by an HIV TAT-CRAC peptide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, n° 3, p. 1267-1272.
- Li W, Hardwick MJ, Rosenthal D, Culty M, Papadopoulos V. (2007) Peripheral-type benzodiazepine receptor overexpression and knockdown in human breast cancer cells indicate its prominent role in tumor cell proliferation. *Biochemical Pharmacology*, vol. 73, n° 4, p. 491-503.
- Li, W.T., Tsao, H.W., Chen, Y.Y., Cheng, S.W. et Hsu, Y.C. (2007). A study on the photodynamic properties of chlorophyll derivatives using human hepatocellular carcinoma cells. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, vol. 6, n° 12, p. 1341-1348.
- Lilla, C., Ambrosone, C.B., Kropp, S., Helmbold, I., Schmezer, P., von Fournier, D., Haase, W., Sautter-Bihl, M.L., Wenz, F. et Chang-Claude, J. (2007). Predictive factors for late normal tissue complications following radiotherapy for breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, vol. 106, n° 1, p. 143-150.
- Luksiene, Z. (2004). Experimental evidence on possibility to radiosensitize aggressive tumors by porphyrins. *Medicina (Kaunas)*, vol. 40, p. 868-874.
- Luksiene, Z., Juzenas, P. et Moan, J. (2006). Radiosensitization of tumours by porphyrins. *Cancer Letters*, vol. 235, n° 1, p. 40-47.
- Madani, I., De Neve, W. et Mareel, M. (2008). Does ionizing radiation stimulate cancer invasion and metastasis? *Bulletin du cancer*, vol. 95, n° 3, p. 292-300.
- Marrett, L., Dryer, D., Logan, H., Mery, L., Morrison, H., Schacter, B., Villeneuve, G., Waters, C. et Semenciw, R. (2007). *Canadian Cancer Statistics 2007*, Toronto.
- Mathai, S., Smith, T.A. et Ghiggino, K.P. (2007). Singlet oxygen quantum yields of potential porphyrin-based photosensitisers for photodynamic therapy. *Photochemical & photobiological sciences : Official journal of the European Photochemistry Association and the European Society for Photobiology*, vol. 6, n° 9, p. 995-1002.

- Maziere, J.C., Santus, R., Morliere, P., Reyftmann, J.P., Candide, C., Mora, L., Salmon, S., Maziere, C., Gatt, S. et Dubertret, L. (1990). Cellular uptake and photosensitizing properties of anticancer porphyrins in cell membranes and low and high density lipoproteins. *Journal of photochemistry and photobiology.B, Biology*, vol. 6, n° 1-2, p. 61-68.
- McCready, D., Holloway, C., Shelley, W., Down, N., Robinson, P., Sinclair, S., Mirsky, D., Breast Cancer Disease Site Group of Cancer Care et Ontario's Program in Evidence-Based Care (2005). Surgical management of early stage invasive breast cancer: a practice guideline. *Canadian journal of surgery. Journal canadien de chirurgie*, vol. 48, n° 3, p. 185-194.
- Mercer-Smith, J.A., Cole, D.A., Roberts, J.C., Lewis, D., Behr, M.J. et Lavalley, D.K. (1989). The biodistribution of radiocopper-labeled compounds. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 258, p. 103-121.
- Michailov, N., Peeva, M., Angelov, I., Wohrle, D., Muller, S., Jori, G., Ricchelli, F. et Shopova, M. (1997). Fluence rate effects on photodynamic therapy of B16 pigmented melanoma. *Journal of photochemistry and photobiology.B, Biology*, vol. 37, n° 1-2, p. 154-157.
- Milanesio ME, Alvarez MG, Bertolotti SG, Durantini EN. (2008) Photophysical characterization and photodynamic activity of metallo 5-(4(trimethylammonium)phenyl)-10,15,20-tris(2,4,6-trimethoxyphenyl)porphyrin in homogeneous and biomimetic media. *Photochemical & Photobiological Sciences*, vol. 7, n° 8, p. 963-972.
- Miller, R.A., Woodburn, K., Fan, Q., Renschler, M.F., Sessler, J.L. et Koutcher, J.A. (1999). In vivo animal studies with gadolinium (III) texaphyrin as a radiation enhancer. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*, vol. 45, n° 4, p. 981-989.
- Miura, M., Morris, G.M., Micca, P.L., Nawrocky, M.M., Makar, M.S., Cook, S.P. et Slatkin, D.N. (2004). Synthesis of copper octabromotetracarboranylphenylporphyrin for boron neutron capture therapy and its toxicity and biodistribution in tumour-bearing mice. *The British journal of radiology*, vol. 77, n° 919, p. 573-580.
- Moan, J., Berg, K., Bommer, J.C. et Western, A. (1992). Action spectra of phtalocyanines with respect to photosensitization of cells. *Photochemistry and photobiology*, vol. 56, n° 2, p. 171-175.
- Moan, J. et Peng, Q. (2003). An outline of the hundred-year history of PDT. *Anticancer Research*, vol. 23, n° 5A, p. 3591-3600.
- Moan, J. et Sommer, S. (1984). Action spectra for hematoporphyrin derivative and Photofrin II with respect to sensitization of human cells in vitro to photoinactivation. *Photochemistry and photobiology*, vol. 40, n° 5, p. 631-634.
- Moertel, C.G., Reitemeier, R.J., Childs, D.S. Jr, Colby, M.Y., Holbrook, M.A. (1964) Combined 5-fluorouracil and supervoltage radiation therapy in the palliative management

- of advanced gastrointestinal cancer: a pilot study. *Mayo Clinic Proceedings*, vol. 39, p. 767–771.
- Muller, K. et Gurster, D. (1993). Hydroxyl radical damage to DNA sugar and model membranes induced by anthralin (dithranol). *Biochemical pharmacology*, vol. 46, n° 10, p. 1695-1704.
- Murashima, T., Sakiyama, D., Miyoshi, D., Kuriyama, M., Yamada, T., Miyazawa, T. et Sugimoto, N. (2008). Cationic porphyrin induced a telomeric DNA to g-quadruplex form in water. *Bioinorganic chemistry and applications*, p. 294756.
- Nigro, N.D., Vaitkevicius, V.K., Considine, B. Jr. (1993) Combined therapy for cancer of the anal canal: a preliminary report—1974. *Diseases of the Colon and Rectum.*, vol. 36, n° 7, p. 709–711.
- Norman, R.A. (2005). Past and future: porphyria and porphyrins. *Skinmed*, vol. 4, n° 5, p. 287-292.
- O'Hara, J.A., Duple, E.B., Abrams, M.J., Picker, D.J., Giandomenico, C.M. et Vollano, J.F. (1989). Potentiation of radiation-induced cell kill by synthetic metalloporphyrins. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, vol. 16, n° 4, p. 1049-1052.
- Ohuchida, K., Mizumoto, K., Murakami, M., Qian, L.W., Sato, N., Nagai, E., Matsumoto, K., Nakamura, T. et Tanaka, M. (2004). Radiation to stromal fibroblasts increases invasiveness of pancreatic cancer cells through tumor-stromal interactions. *Cancer research*, vol. 64, n° 9, p. 3215-3222.
- Pal, P., Zeng, H., Durocher, G., Girard, D., Li, T., Gupta, A.K., Giasson, R., Blanchard, L., Gaboury, L., Balassy, A., Turmel, C., Laperriere, A. et Villeneuve, L. (1996). Phototoxicity of some bromine-substituted rhodamine dyes: synthesis, photophysical properties and application as photosensitizers. *Photochemistry and photobiology*, vol. 63, n° 2, p. 161-168.
- Pandey, S.K., Gryshuk, A.L., Sajjad, M., Zheng, X., Chen, Y., Abouzeid, M.M., Morgan, J., Charamisinau, I., Nabi, H.A., Oseroff, A. et Pandey, R.K. (2005). Multimodality agents for tumor imaging (PET, fluorescence) and photodynamic therapy. A possible "see and treat" approach. *Journal of medicinal chemistry*, vol. 48, n° 20, p. 6286-6295.
- Paquette, B., Baptiste, C., Therriault, H., Arguin, G., Plouffe, B. et Lemay, R. (2007). In vitro irradiation of basement membrane enhances the invasiveness of breast cancer cells. *British journal of cancer*, vol. 97, n° 11, p. 1505-1512.
- Paquette, B., R. Lemay, C. Pépin, L. Tremblay et M. Lepage (2008). The invasiveness of breast cancer cell is enhanced by radiation. Communication personnelle. Vancouver, Canada.
- Park, C.M., Park, M.J., Kwak, H.J., Lee, H.C., Kim, M.S., Lee, S.H., Park, I.C., Rhee, C.H. et Hong, S.I. (2006). Ionizing radiation enhances matrix metalloproteinase-2 secretion and invasion of glioma cells through Src/epidermal growth factor receptor-mediated p38/Akt

- and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *Cancer research*, vol. 66, n° 17, p. 8511-8519.
- Parkin, D.M., Bray, F., Ferlay, J. et Pisani, P. (2001). Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, vol. 94, n° 2, p. 153-156.
- Patchell, R.A., Tibbs, P.A., Regine, W.F., Dempsey, R.J., Mohiuddin, M., Kryscio, R.J., Markesbery, W.R., Foon, K.A. et Young, B. (1998). Postoperative radiotherapy in the treatment of single metastases to the brain: a randomized trial. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, vol. 280, n° 17, p. 1485-1489.
- Ponette V, Le Péchoux C, Deniaud-Alexandre E, Fernet M, Giocanti N, Tourbez H, Favaudon V. (2000) Hyperfast, early cell response to ionizing radiation. *International Journal of Radiation Biology*, vol.76, n°9, p. 1233-1243.
- Moser, J.G. *Photodynamic, tumour therapy: 2nd and 3rd generation photosensitizers*. (1998). New Delhi, Harwood Academic Publishers.
- Ow, YP, Green, DR, Hao, Z, Mak, TW. (2008) Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol.9, n°7, p.532-542.
- Prise, K.M., Schettino, G., Folkard, M. et Held, K.D. (2005). New insights on cell death from radiation exposure. *The lancet oncology*, vol. 6, n° 7, p. 520-528.
- Pushpan, S.K., Venkatraman, S., Anand, V.G., Sankar, J., Parmeswaran, D., Ganesan, S. et Chandrashekar, T.K. (2002). Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents*, vol. 2, n° 2, p. 187-207.
- Qian, L.W., Mizumoto, K., Urashima, T., Nagai, E., Maehara, N., Sato, N., Nakajima, M. et Tanaka, M. (2002). Radiation-induced increase in invasive potential of human pancreatic cancer cells and its blockade by a matrix metalloproteinase inhibitor, CGS27023. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 8, n° 4, p. 1223-1227.
- Qiu, Y.L., Ksehati, M.B., Ptak, R.G., Fan, B.Y., Breitenbach, J.M., Lin, J.S., Cheng, Y.C., Kern, E.R., Drach, J.C. et Zemlicka, J. (1998). (Z)- and (E)-2-((hydroxymethyl)cyclopropylidene)methyladenine and -guanine. New nucleoside analogues with a broad-spectrum antiviral activity. *Journal of medicinal chemistry*, vol. 41, n° 1, p. 10-23.
- Richards, G.M. et Mehta, M.P. (2007). Motexafin gadolinium in the treatment of brain metastases. *Expert opinion on pharmacotherapy*, vol. 8, n° 3, p. 351-359.
- Roberts, J.C., Newmyer, S.L., Mercer-Smith, J.A., Schreyer, S.A. et Lavalley, D.K. (1989). Labeling antibodies with copper radionuclides using N-4-nitrobenzyl-5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-tris(4-sulfophenyl) porphine. *International journal of radiation applications and instrumentation. Part A, Applied radiation and isotopes*, vol. 40, n° 9, p. 775-781.

- Roninson, I.B., Broude, E.V. et Chang, B.D. (2001). If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, vol. 4, n° 5, p. 303-313.
- Roots, R. et Okada, S. (1975). Estimation of life times and diffusion distances of radicals involved in x-ray-induced DNA strand breaks of killing of mammalian cells. *Radiation research*, vol. 64, n° 2, p. 306-320.
- Ross, G.M. (1999). Induction of cell death by radiotherapy. *Endocrine-related cancer*, vol. 6, n° 1, p. 41-44.
- Rousset, N., Vonarx, V., Eleouet, S., Carre, J., Bourre, L., Lajat, Y. et Patrice, T. (2000). Cellular distribution and phototoxicity of benzoporphyrin derivative and Photofrin. *Research in experimental medicine. Zeitschrift fur die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie*, vol. 199, n° 6, p. 341-357.
- Schaffer, M., Ertl-Wagner, B., Schaffer, P.M., Kulka, U., Hofstetter, A., Duhmke, E. et Jori, G. (2003). Porphyrins as Radiosensitizing Agents for Solid Neoplasms. *Current pharmaceutical design*, vol. 9, n° 2, p. 2024.
- Schaffer, M., Ertl-Wagner, B., Schaffer, P.M., Kulka, U., Jori, G., Wilkowski, R., Hofstetter, A. et Duhmke, E. (2006). Feasibility of photofrin II as a radiosensitizing agent in solid tumors-preliminary results. *Onkologie*, vol. 29, n° 11, p. 514-519.
- Schaffer, M., Schaffer, P.M., Corti, L., Gardiman, M., Sotti, G., Hofstetter, A., Jori, G. et Duhmke, E. (2002). Photofrin as a specific radiosensitizing agent for tumors: studies in comparison to other porphyrins, in an experimental in vivo model. *Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology*, vol. 66, n° 3, p. 157-164.
- Schmidt-Ullrich, R.K., Valerie, K., Chan, W., Wazer, D.E. et Lin, P.S. (1992). Expression of oestrogen receptor and transforming growth factor-alpha in MCF-7 cells after exposure to fractionated irradiation. *International journal of radiation biology*, vol. 61, n° 3, p. 405-415.
- Selke, M.P.D. What is singlet oxygen ? [En ligne]. Site Internet personnel de Matthias Selke Ph.D. Department of Chemistry and Biochemistry, University of California, Los Angeles, (2007), <http://www.calstatela.edu/dept/chem/selke/r-1.htm> (Page consultée le 11 novembre 2007).
- Sessler, J.L. et Miller, R.A. (2000). Texaphyrins: New drugs with diverse clinical applications in radiation and photodynamic therapy. *Biochemical Pharmacology*, vol. 59, n° 7, p. 733-739.
- Sharman, W.M., Allen, C.M. et van Lier, J.E. (2000). Role of activated oxygen species in photodynamic therapy. In Lester Packer and Helmut Sies, *Methods in Enzymology*, p. 376-400. Academic Press.

- Shayeghi, M., Latunde-Dada, G. O., Oakhill, J. S., Laftah, A. H., Takeuchi, K., Halliday, N., et al. (2005). Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, vol. 122, n° 5, p. 789–801.
- Shi, Y. (2001). A structural view of mitochondria-mediated apoptosis. *Nature structural biology*, vol. 8, n° 5, p. 394-401.
- Silva, E.M., Serra, V.V., Ribeiro, A.O., Tome, J.P., Domingues, P., Faustino, M.A., Neves, M.G., Tome, A.C., Cavaleiro, J.A., Ferrer-Correia, A.J., Iamamoto, Y. et Domingues, M.R. (2006). Characterization of cationic glycoporphyrins by electrospray tandem mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, vol. 20, n° 23, p. 3605-3611.
- Silva JN, Filipe P, Morlière P, Mazière JC, Freitas JP, Gomes MM, Santos R. (2008) Photodynamic therapy: Dermatology and ophthalmology as main fields of current applications in clinic. *Bio-Medical Materials & Engineering*, vol.18, n° 4-5, p. 319-327.
- Sitnik, T.M., Hampton, J.A. et Henderson, B.W. (1998). Reduction of tumour oxygenation during and after photodynamic therapy in vivo: effects of fluence rate. *British journal of cancer*, vol. 77, n° 9, p. 1386-1394.
- Snyder, S.H., Verma, A. et Trifiletti, R.R. (1987). The peripheral-type benzodiazepine receptor: a protein of mitochondrial outer membranes utilizing porphyrins as endogenous ligands. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, vol. 1, n° 4, p. 282-288.
- Société canadienne du cancer et Institut national du cancer du Canada : Statistiques canadiennes sur le cancer 2008, Toronto, Canada. (2008) ISSN 0835-2976
- Speake, W.J., Dean, R.A., Kumar, A., Morris, T.M., Scholefield, J.H. et Watson, S.A. (2005). Radiation induced MMP expression from rectal cancer is short lived but contributes to in vitro invasion. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*, vol. 31, n° 8, p. 869-874.
- Star, W.M. (1995). In vivo action spectra, absorption and fluorescence excitation spectra of photosensitizers for photodynamic therapy. *Journal of photochemistry and photobiology.B, Biology*, vol. 28, n° 1, p. 101-102.
- Svaasand, L.O. (1985). Photodynamic and photohyperthermic response of malignant tumors. *Medical physics*, vol. 12, n° 4, p. 455-461.
- Szumiel, I. (1994). Ionizing radiation-induced cell death. *International journal of radiation biology*, vol. 66, n° 4, p. 329-341.
- Taketani, S., Ishigaki, M., Mizutani, A., Uebayashi, M., Numata, M., Ohgari, Y. et Kitajima, S. (2007). Heme synthase (ferrochelatase) catalyzes the removal of iron from heme and demetalation of metalloporphyrins. *Biochemistry*, vol. 46, n° 51, p. 15054-15061.

- Talbot, S.J. et Crawford, D.H. (2004). Viruses and tumours--an update. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, vol. 40, n° 13, p. 1998-2005.
- Thorwarth, D., Eschmann, S.M., Paulsen, F. et Alber, M. (2007). A model of reoxygenation dynamics of head-and-neck tumors based on serial 18F-fluoromisonidazole positron emission tomography investigations. *International journal of radiation oncology, biology, physics*, vol. 68, n° 2, p. 515-521.
- Tomazela, D.M., Gozzo, F.C., Mayer, I., Engelmann, F.M., Araki, K., Toma, H.E. et Eberlin, M.N. (2004). Electrospray mass and tandem mass spectrometry of homologous and isomeric singly, doubly, triply and quadruply charged cationic ruthenated meso-(phenyl)m-(meta- and para-pyridyl)n (m + n = 4) macrocyclic porphyrin complexes. *Journal of mass spectrometry : JMS*, vol. 39, n° 10, p. 1161-1167.
- Tremblay-Morin, J.P. (2005). *Porphyries cationiques bromées pour la radiothérapie et chimie verte catalysée*. M.Sc., Université de Sherbrooke, Ottawa : Bibliothèques et Archives Canada.
- Tubiana, M., J. Dutreix et A. Wambersie (1986). *Radiobiologie*. Hermann édition, Paris.
- Tubiana, M., Averbeck, D., Bourguignon, M., Bouhis, J., Cassiman, J.-J., Cosset, J.-M., Favaudon, V., Gardès-Albert, M., Girinski, T., Gourmelon, P., Helfre, S., Lartigau, E., Masse, R., Wambersie, A. (2008). *Radiobiologie. Radiothérapie et radioprotection : bases fondamentales*. Hermann édition, Paris, collection Médecine/Santé, 502 pages, p. 221-238.
- Usami, N., Kobayashi, K., Maezawa, H., Hieda, K. et Ishizaka, S. (1991). Biological effects of Auger processes of bromine on yeast cells induced by monochromatic synchrotron X-rays. *International journal of radiation biology*, vol. 60, n° 5, p. 757-768.
- Verma, A., Facchina, S.L., Hirsch, D.J., Song, S.Y., Dillahey, L.F., Williams, J.R. et Snyder, S.H. (1998). Photodynamic tumor therapy: mitochondrial benzodiazepine receptors as a therapeutic target. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, vol. 4, n° 1, p. 40-45.
- Verma, A., Nye, J.S. et Snyder, S.H. (1987). Porphyrins are endogenous ligands for the mitochondrial (peripheral-type) benzodiazepine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 84, n° 8, p. 2256-2260.
- Verma, A. et Snyder, S.H. (1988). Characterization of porphyrin interactions with peripheral type benzodiazepine receptors. *Molecular pharmacology*, vol. 34, n° 6, p. 800-805.
- Viala, J., Vanel, D., Meingan, P., Lartigau, E., Carde, P. et Renschler, M. (1999). Phases IB and II multidose trial of gadolinium texaphyrin, a radiation sensitizer detectable at MR imaging: preliminary results in brain metastases. *Radiology*, vol. 212, n° 3, p. 755-759.
- Vicente, M.G. (2001). Porphyrin-based sensitizers in the detection and treatment of cancer: recent progress. *Current medicinal chemistry. Anti-cancer agents*, vol. 1, n° 2, p. 175-194.

- Vicencio, JM, Galluzzi, L, Tajeddine, N, Ortiz, C, Criollo, A, Tasdemir, E, Morselli, E. (2008) Senescence, apoptosis or autophagy? When a damaged cell must decide its path—a mini-review. *Gerontology*, vol. 54, n° 2, p. 92-99.
- Wagner, J. R. (2006). *Radiation chemistry I (notes de cours RBL 726)*. Unpublished manuscript.
- Wainwright, M. (1996). Non-Porphyrin Photosensitizers in Biomedicine. *Chemical Society Reviews*, vol. 25, n° 5, p. 351-359.
- Wang, H.W., Putt, M.E., Emanuele, M.J., Shin, D.B., Glatstein, E., Yodh, A.G. et Busch, T.M. (2004). Treatment-induced changes in tumor oxygenation predict photodynamic therapy outcome. *Cancer research*, vol. 64, n° 20, p. 7553-7561.
- Wang, J.B. et Liu, L.X. (2007). Use of photodynamic therapy in malignant lesions of stomach, bile duct, pancreas, colon and rectum. *Hepato-gastroenterology*, vol. 54, n° 75, p. 718-724.
- Wang, J.L., Sun, Y. et Wu, S. (2000). Gamma-irradiation induces matrix metalloproteinase II expression in a p53-dependent manner. *Molecular carcinogenesis*, vol. 27, n° 4, p. 252-258.
- West AR, Oates PS. (2008) Mechanisms of heme iron absorption: current questions and controversies. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, vol. 14, n° 26, p. 4101-4110.
- Wild-Bode, C., Weller, M., Rimner, A., Dichgans, J. et Wick, W. (2001). Sublethal irradiation promotes migration and invasiveness of glioma cells: implications for radiotherapy of human glioblastoma. *Cancer research*, vol. 61, n° 6, p. 2744-2750.
- Witte, A.B., Anestal, K., Jerremalm, E., Ehrsson, H. et Arner, E.S. (2005). Inhibition of thioredoxin reductase but not of glutathione reductase by the major classes of alkylating and platinum-containing anticancer compounds. *Free radical biology & medicine*, vol. 39, n° 5, p. 696-703.
- Wöhrle, D., Hirth, A., Bogdahn-Rai, Schnurpfeil, G. et Shopova, M. (1998). Photodynamic therapy of cancer: Second and third generations of photosensitizers. *Russian Chemical Bulletin*, vol. 47, n° 5, p. 807-816.
- Woodburn, K.W., Vardaxis, N.J., Hill, J.S., Kaye, A.H., Reiss, J.A. et Phillips, D.R. (1992). Evaluation of porphyrin characteristics required for photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*, vol. 55, n° 5, p. 697-704.
- Wyld, L., Reed, M.W. et Brown, N.J. (2001). Differential cell death response to photodynamic therapy is dependent on dose and cell type. *British journal of cancer*, vol. 84, n° 10, p. 1384-1386.
- Yamashita, T., Uno, T. et Ishikawa, Y. (2005). Stabilization of guanine quadruplex DNA by the binding of porphyrins with cationic side arms. *Bioorganic & medicinal chemistry*, vol. 13, n° 7, p. 2423-2430.

- Yang, S.I., Seth, J., Strachan, J.-., Gentlemann, S., Kim, D., Holten, D., Lindsey, J.S. et Bocian, D.F. (1999). Ground and Excited State Electronic Properties of Halogenated Tetraarylporphyrins. Tuning the Building Blocks for Porphyrin-based Photonic Devices. *Journal of Porphyrins and Phtalocyanines*, vol. 3, n° 2, p. 117-147.
- Yang, L., Cao, Z., Yan, H. et Wood, W.C. (2003). Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy. *Cancer research*, vol. 63, n° 20, p. 6815-6824.
- Young, S.W., Qing, F., Harriman, A., Sessler, J.L., Dow, W.C., Mody, T.D., Hemmi, G.W., Hao, Y. et Miller, R.A. (1996a). Gadolinium(III) texaphyrin: a tumor selective radiation sensitizer that is detectable by MRI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, n° 13, p. 6610-6615.
- Young, S.W., Qing, F., Harriman, A., Sessler, J.L., Dow, W.C., Mody, T.D., Hemmi, G.W., Hao, Y. et Miller, R.A. (1996b). Gadolinium(III) texaphyrin: a tumor selective radiation sensitizer that is detectable by MRI. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 93, n° 13, p. 6610-6615.
- Zhai, G.G., Malhotra, R., Delaney, M., Latham, D., Nestler, U., Zhang, M., Mukherjee, N., Song, Q., Robe, P. et Chakravarti, A. (2006). Radiation enhances the invasive potential of primary glioblastoma cells via activation of the Rho signaling pathway. *Journal of neuro-oncology*, vol. 76, n° 3, p. 227-237.
- Zhang, X. et Xu, H. (1993). Influence of Halogenation and Aggregation on Photosensitizing properties of Zinc Phtalocyanine (ZnPc). *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, vol. 89, n° 18, p. 3347-3351.
- Zhang HJ, Wang XF, Wang P, Ai XC, Zhang JP. (2008) Spectroscopic study on the binding of a cationic porphyrin to DNA G-quadruplex under different K⁺ concentrations. *Photochemical & Photobiological Siences*, vol. 7, n° 8, p. 948-955.
- Zhao P, Xu, LC, Huang, JW, Fu, B, Yu, HC, Zhang, WH, Chen, J, Yao, JH, Ji, LN. (2008) DNA-binding and photocleavage properties of cationic porphyrin-anthraquinone hybrids with different lengths of links. *Bioorganic Chemistry*, vol.36, n° 6, p. 278-287.