



HAL
open science

Utilisation de nouveaux photosensibilisateurs pour le traitement du cancer de la prostate par photothérapie dynamique: Etude in vitro et in vivo

Chloë Fidanzi-Dugas

► **To cite this version:**

Chloë Fidanzi-Dugas. Utilisation de nouveaux photosensibilisateurs pour le traitement du cancer de la prostate par photothérapie dynamique: Etude in vitro et in vivo. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0085 . tel-01435144

HAL Id: tel-01435144

<https://theses.hal.science/tel-01435144v1>

Submitted on 13 Jan 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Limoges
Ecole Doctorale Thématique 524 Biologie, Santé, « Biosanté »
EA1069 – Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN)
FACULTE DE PHARMACIE

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges

Discipline/Spécialité : Biologie Cellulaire et Biologie Moléculaire

Présentée et soutenue par
Chloë FIDANZI-DUGAS

**Utilisation de nouveaux photosensibilisateurs pour le
traitement du cancer de la prostate par photothérapie
dynamique**

Etude in vitro et in vivo

Le 14 décembre 2016

Thèse dirigée par :
M. David Yannick LEGER, Maître de Conférences (MCU)
M. Bertrand LIAGRE, Professeur des Universités

JURY :

Président du jury

M. Philippe BILLIALD, Professeur, Faculté de Pharmacie, Université de Paris XI

Rapporteurs

Mme Muriel BARBERI-HEYOB, Professeur, Université de Lorraine

Mme Magali GARY-BOBO, Docteur, Université de Montpellier

Examineur

M. Vincent SOL, Professeur, Faculté des Sciences et Techniques, Limoges



A mon grand-père,

« Si vous ne travaillez pas pour vos rêves, quelqu'un vous embauchera pour travailler pour les siens. »

- Steve Jobs -



REMERCIEMENTS

A M. le Professeur Philippe BILLIALD

Professeur des Universités

Université de Paris-Sud - Faculté de Pharmacie - Laboratoire de Biochimie ; EA 4530.

Je suis très touchée de l'honneur que vous me faites en acceptant d'être le Président du Jury de ma soutenance de thèse. Soyez assuré, Monsieur, de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

A Mme le Professeur Muriel BARBERI-HEYOB

Professeur des Universités

Université de Lorraine – Faculté de Médecine – Centre de Recherche en Automatique de Nancy UMR 7039

Veillez accepter mes plus sincères remerciements pour votre présence dans ce jury et pour avoir accepté de juger mon travail en tant que rapporteur. Soyez assurée, Madame, de tout mon respect et de ma profonde gratitude.

A Mme le Docteur Magali GARY-BOBO

Chargée de Recherche (CR)

Université de Montpellier - Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM)

Je tenais à vous remercier d'avoir accepté de juger mon travail de thèse et de faire partie de ce jury. Soyez assurée, Madame, de toute ma reconnaissance et de tout mon respect.

A M. le Professeur Vincent SOL

Professeur – Directeur du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles

EA 1069 Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de Limoges – Faculté des Sciences et Techniques

Je tenais à vous remercier pour la confiance que vous m'avez accordée, pour votre disponibilité et vos conseils durant mon stage de Master 2 et durant ces trois années de doctorat. Vous avez été présent pour ma première communication orale dans le cadre du Melusyn (Médecine et Lumière Synchrotron) à Orsay et je vous en remercie. Merci de m'avoir donné tous les moyens nécessaires pour avancer dans mon projet de recherche et d'avoir accepté de faire partie de ce jury. Je vous en suis très reconnaissante. Soyez assuré, Vincent, de toute ma gratitude et de mon profond respect.



A M. le Professeur Bertrand LIAGRE

Professeur des Universités

EA 1069 Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de Limoges – Faculté de Pharmacie

Co-directeur de thèse

Je tenais à te remercier pour la confiance que tu m'as accordée mais également pour ta disponibilité au cours de ces années passées dans ce laboratoire. Cette thèse a été pour moi l'occasion d'apprendre, d'échanger et de progresser. Tu as toujours mis à ma disposition tous les moyens nécessaires à l'avancée de mes travaux et je t'en remercie. Sois assuré, Bertrand, de toute ma reconnaissance et de tout mon respect.

A M. le Docteur David Yannick LEGER

Maître de Conférences

EA 1069 Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de Limoges – Faculté de Pharmacie

Co-directeur de thèse

Et dire que tout a commencé avec un mail que je t'ai envoyé d'Australie, j'étais loin de me douter qu'il me mènerait jusqu'ici. Tu feras partie de ces rencontres qui marquent une vie. Je tenais à te faire part de mes plus sincères remerciements pour m'avoir donné l'opportunité de faire cette thèse au sein de cette équipe. Au cours de ces années, tu as su répondre présent malgré l'emploi du temps plus que surchargé que tu avais. Tes conseils, ton optimisme et ta confiance ont été des éléments précieux de ce travail et je t'en remercie. Nous ne serons pas partis en Crête, mais finalement, Clermont-Ferrand c'est bien aussi. Nos nombreuses discussions m'ont permis de progresser et ont égayé mon quotidien. Sois assuré, David, de toute mon estime et de toute ma reconnaissance.

A Lamia GHEZALI

Qui aurait cru qu'une petite blonde timide et une kabile qui n'a pas sa langue dans sa poche puisse aussi bien s'entendre ? Lamia, merci pour ces folles premières années de thèse que tu m'as fait vivre. Je n'oublierai jamais tout ce que tu as pu m'apporter. Merci pour tous tes conseils, ton soutien et surtout merci pour ton amitié.

A Saada DIAB,

La dernière du trinôme libanaise/kabile/petite blonde... Merci pour ta présence au quotidien, ta gentillesse et toutes les petites attentions que tu as eues à mon égard tout ce temps. Ton départ au Liban a été difficile mais je sais à quel point tu es beaucoup plus heureuse là-bas. Je ne te souhaite que du bon en espérant pouvoir, un jour, venir partager un verre avec toi au SkyBar de Beyrouth !

A Bassel ISMAIL,

Je te remercie pour ta bonne humeur quotidienne qui a fait de mes premières années au sein du laboratoire de très belles années. Je te remercie pour les fous rires que j'ai pu avoir grâce à toi et pour tes déclarations qui étaient encore plus folles les unes que les autres.



A Frédérique MARTIN,

Je te remercie Fred pour ta présence au quotidien. Le « petit lutin » que je suis a été ravi de partager ce quotidien à tes côtés. Tu as su être là et trouver les bons mots aux bons moments. Merci.

A Youness LIMAMI,

Mon arabe... Merci d'avoir été là pour moi à chaque moment : des conseils pour les manips, des pauses cafés pour les potins, des dépannages de voiture tard dans la nuit ou tôt le matin. Ta présence a été un soutien quotidien et je t'en serai éternellement reconnaissante.

A Aline PINON,

Nous sommes tous obligés de te remercier pour ces fameuses commandes ! Je te remercie d'avoir tenu le choc lorsque je venais te voir sans arrêt pour commander des produits à n'importe quel moment de la journée. Le « petit bout » que je suis te remercie pour ta bonne humeur, ta patience et ta disponibilité et veut que tu saches que tu peux compter sur lui à tout moment.

A Guillaume CHEMIN,

Merci pour ton aide, ton soutien, et tes conseils lors de cette dernière année de thèse. Sois assuré, Guillaume de toute ma reconnaissance.

A Adeline, Elise, Fabien, Kélian, Quentin, Sarah, Clémence, Maxime, Anne-Alexandra

Ce n'est pas par ordre de préférence mais par ordre chronologique (sinon sois sûr, Fabien, que tu aurais été cité en premier ! ☺) Vous avez partagé mon quotidien pour 1 ou 2 mois de stage et j'ai été ravie de pouvoir vous apporter un petit quelque chose. De mon côté, vous avez été pour moi, chacun à votre tour, un petit concentré de fous rires, de décompression et d'amitié. Merci à vous.

A Fatima, Lama, Josiane

Je vous remercie toutes les trois pour toutes les petites attentions que vous avez eues pour moi. Et je ne parlerai pas des kilos que j'ai pris en dégustant toutes les bonnes choses que vous aviez préparées. Merci à vous.

Aux membres du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles de Limoges

Je tenais à tous vous remercier pour m'avoir accueillie au sein du laboratoire et pour l'ambiance au quotidien. Je pense tout particulièrement à Alain, Christiane, Christelle, Laëtitia, Aurélie, Aurélie, Benjamin, Caroline, Yves, Catherine, Michelle, Tan, Sylvie D, Claude, qui ont été disponibles dès que j'en ai eu besoin. Je vous en remercie.

A Aurélie, Sabrina, Clément, Amazigh, Hafida, Sofiane, Thomas, Hussein, Sandra, Barbara, Gaëlle, Serge, Fabrice

Je vous remercie pour votre disponibilité à chaque fois que j'ai eu besoin de conseils ou de produits. J'ai toujours été très bien reçue au sein de votre équipe, c'est toujours un plaisir de descendre quelques étages pour passer de bons moments avec vous.



A Mme Claire CARRION

Ingénieur d'Etudes – Responsable de la plate-forme de microscopie confocale

UMR CNRS 7276/ Université de Limoges – Faculté de Médecine

Je tenais à te remercier pour ta disponibilité et ton aide tout au long de mes expériences de microscopie confocale qui fuent, avouons-le, un véritable calvaire ! Elles m'auront tout de même permis de me rendre compte de ta gentillesse et de ta bonne humeur quotidienne. Sois assurée, Claire, de toute ma reconnaissance et de tout mon respect.

A Mme Sandrine ROBERT et au service d'Anatomie-Pathologie du CHU

Je tenais à vous remercier pour votre disponibilité et la rapidité de votre travail qui ont été indispensables au bon déroulement de cette thèse. Soyez assurés de toute ma reconnaissance.

A Mme le Professeur Véronique BLANQUET

Professeur des Universités – Directrice de l'Institut Génomique, Environnement, Immunité, Santé et Thérapeutiques

UMR 1061 INRA/Université de Limoges - Faculté des Sciences et Techniques

Je tenais à vous remercier pour la confiance que vous m'avez accordée durant tout mon cursus universitaire. En 2010, vous m'avez accueillie pour mon premier stage au sein d'un laboratoire de recherche. Ce fut le début d'une belle aventure. Depuis, vous avez toujours été disponible lorsque j'en ai eu besoin. Aussi, l'opportunité d'avoir été représentante des doctorants de votre Ecole Doctorale (BioSanté) m'a permis d'en apprendre davantage sur le fonctionnement de l'Institut et je vous en remercie. Soyez assurée de mon plus profond respect et de ma plus profonde gratitude.

A M. le Docteur Fabrice DUPUY

Maître de Conférences - Directeur du département pédagogique Sciences du Vivant

UMR 1061 INRA/Université de Limoges - Faculté des Sciences et Techniques

Je tenais à vous dire que je vous suis sincèrement reconnaissante pour la confiance que vous m'avez accordée durant ces trois années d'enseignement au sein de votre équipe pédagogique. Ce fut un réel plaisir de travailler dans de telles conditions et de découvrir le métier d'enseignant que j'ai adoré. Enfin, il me paraît indispensable de vous remercier pour les conseils que vous m'avez donnés pour ce qui m'attend après cette thèse. Ils m'ont été d'une très grande aide. Merci.

Aux membres de l'équipe pédagogique « Science du Vivant », notamment Florence VALLEIX et Sabine LHERNOULD

Enseigner à vos côtés a été une réelle expérience humaine. Je vous remercie pour votre disponibilité et votre confiance.

Aux membres du Scientibus, notamment Frédéric LOURADOUR, Mireille VERDIER et Patrick TROUILLAS,

Devenir animatrice du Scientibus a été pour moi une très chouette expérience et partager ces sorties avec vous a été un réel plaisir. Je vous en remercie.



A Yohann, Axelle, Bilel, mes complices DCACEs

Je vous remercie pour ces enseignements (TP ou Scientibus) passés à vos côtés, pour ces formations DCACE souvent bien trop longues mais plus qu'attendues pour pouvoir vous revoir et aussi pour ces soirées ciné Super-héros en VO. Trois années de thèse qui sont (enfin) finies pour nous 4 ! Bon vent pour la suite !

A mes amis de toujours, Guillaume, Claire, Pierre, Marie-Bé, Juliette, Bertrand

Vous qui répondez toujours présents à chaque moment de ma vie... Merci pour votre présence, votre soutien et votre amitié inconditionnelle. Soyez assurés de toute mon amitié sincère.

A Maxime,

Durant ces trois années de thèse, il y a eu des hauts, des bas, puis des hauts et encore des bas... mais on a toujours su être là l'un pour l'autre. Merci à toi, collègue de western-blot, partenaire de pauses café (ou plutôt de pauses « chocolats viennois avec beaucoup mais vraiment beaucoup de chantilly, s'il vous plait ») et surtout ami de vie. Je te remercie pour ton soutien indispensable, ton oreille attentive et ton amitié sincère. Sois assuré de toute ma reconnaissance et de mon amitié sincère.

A ma famille

A mes parents, sans qui tout cela n'aurait pas été possible, merci pour tout, pour cette vie géniale que j'ai, pour votre soutien et votre présence dans tout ce que j'entreprends. Merci d'être un pilier de ma vie.

A mes sœurs et beaux-frères, merci d'être vous et de faire de moi la petite (belle)-sœur la plus chanceuse. Je suis ravie que vous puissiez répondre présents pour ma soutenance durant laquelle vous allez tout comprendre, j'en suis (presque) sûre !

A ma belle-famille devenue ma famille, merci à vous pour votre bonne humeur au quotidien, votre présence et votre soutien qui comptent beaucoup pour moi.

A Timothée

Je te remercie pour ta présence inconditionnelle à mes côtés, pour ton soutien, et cette vie au quotidien que tu as su rendre parfaite. Je te remercie d'être qui tu es et d'avoir réussi à survivre à toutes mes crises de panique et de découragement. Tu ne seras pas là pour conclure ces trois années de thèse mais tu ne seras pas loin : je sais que, 2 amphis plus loin, c'est aussi ton avenir qui s'écrira. Alors j'ai hâte de voir ce que donnera cette suite à tes côtés.

A ceux qui ont été là, de près comme de loin,

A tous ceux qui ont cru en moi et m'ont portée par leurs conseils et leur présence durant ces dernières années, du fond du cœur, merci.

Grâce à vous tous, ces quelques pages du livre de ma vie auront été un concentré d'expériences humaines qui m'ont construite. Un chapitre se termine mais, grâce à vous, je vais pouvoir écrire la suite en toute confiance. Merci.



DROITS D'AUTEURS

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



SOMMAIRE

Remerciements.....	3
Droits d'auteurs.....	8
Sommaire	9
Liste des abréviations	11
Introduction.....	19
Partie bibliographique	22
Chapitre I. Le cancer de la prostate.....	23
I.1. La prostate.....	23
I.2. Le cancer de la prostate	26
I.3. La transformation de l'androgéno-dépendance à l'androgéno-indépendance	34
I.4. Les traitements	39
Chapitre II. La photothérapie dynamique (PDT)	48
II.1. Les mécanismes de la photothérapie dynamique	48
II.2. Les réactions photochimiques.....	49
II.3. Le photo-blanchiment des PS	52
II.4. Les photosensibilisateurs.....	52
II.5. Intérêt des polyamines dans le ciblage des cellules tumorales	64
II.6. Photothérapie dynamique en oncologie prostatique.....	72
Chapitre III. La mort cellulaire programmée ou apoptose	75
III.1. Les rôles physiologiques de l'apoptose.....	75
III.2. Les voies d'induction de l'apoptose.....	76
III.3. Mort cellulaire programmée et photothérapie dynamique anticancéreuse	86
Chapitre IV. La transduction du signal	88
IV.1. La voie des MAPKS.....	88
IV.2. La voie de NF- κ B.....	92
IV.3. Voies de Transduction du signal et cancer de la prostate	93
IV.4. Voies de transduction du signal et thérapie photodynamique	94
Chapitre V. La cyclooxygénase-2 et son inhibition	96
V.1. Les cyclooxygénases	96
V.2. La régulation de la cyclooxygénase-2.....	101
V.3. La prostaglandine E ₂ , métabolite principal de la voie des COXs.....	103
V.4. Implication de la voie COX-2 dans le cancer de la prostate	104
V.5. L'inhibition de COX-2 comme nouvelle stratégie anticancéreuse	106
Chapitre VI. L'autophagie	108
VI.1. Les différentes formes d'autophagie	108
VI.2. Les étapes de la macro-autophagie.....	109
VI.3. Les voies de régulation de l'autophagie	113
VI.4. L'implication de l'autophagie dans la cancérogenèse	116
VI.5. Le paradoxe autophagie/cancer	116
VI.6. Autophagie et photothérapie dynamique	118
Projet de recherche	120
Matériels et Méthodes.....	121
Chapitre I. Expérimentations <i>in vitro</i>	122
I.1. Lignées cellulaires et culture.....	122



I.2. Obtention de lignées transfectées stables.....	122
I.3. Traitement et irradiation	123
I.4. Etude de la viabilité cellulaire.....	123
I.5. Analyse du cycle cellulaire.....	124
I.6. Localisation des photosensibilisateurs	124
I.7. Dosage du taux d'espèces oxygénées réactives.....	124
I.8. Etude du potentiel membranaire mitochondrial	125
I.9. Analyse de l'expression de protéines.....	125
I.10. Analyse de l'activation de la caspase-3.....	128
I.11. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN.....	128
I.12. Analyse de l'activation des MAP Kinases.....	129
I.13. Analyse de retard sur gel.....	129
I.14. Dosage du taux de prostaglandine E ₂	130
I.15. Statistiques.....	131
Chapitre II. Expérimentations <i>in vivo</i>	132
II.1. Xénogreffes de cellules cancéreuses prostatiques humaines, traitement et irradiation ...	132
II.2. Etude de la croissance tumorale.....	132
II.3. Inclusion des tumeurs en paraffine	132
II.4. Colorations et marquages immuno-histologiques des coupes tumorales	133
Partie Expérimentale	134
Chapitre I. Expérimentations <i>in vitro</i>	135
I.1. Protoporphyrine IX polyaminée et viabilité cellulaire	135
I.2. Protoporphyrine IX polyaminée et localisation intracellulaire.....	140
I.3. Protoporphyrine IX polyaminée et cycle cellulaire	143
I.4. Protoporphyrine IX polyaminée et mort cellulaire programmée	151
I.5. Protoporphyrine IX polyaminée et transduction du signal dans les cellules PC-3.....	163
I.6. Protoporphyrine IX polyaminée et voie de la cyclooxygénase-2.....	166
I.7. Protoporphyrine IX et autophagie.....	177
Chapitre II. Expérimentations <i>in vivo</i>	184
II.1. Etude des variations du volume tumoral	185
II.2. Absence d'effet des PS sur la structure des tumeurs.....	187
II.3. Diminution de la prolifération des tumeurs	188
II.4. Diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 au sein des tumeurs....	189
Discussion	190
Chapitre I. Etude <i>in vitro</i> des effets de nouveaux photosensibilisateurs pour le traitement du cancer de la prostate par photothérapie dynamique	192
I.1. Intérêt de la vectorisation de la PpIX par des polyamines	192
I.2. Induction d'un blocage du cycle cellulaire	194
I.3. Induction de la mort cellulaire programmée ou apoptose	196
I.4. Modulation des voies de transduction du signal et de résistance à l'apoptose	198
Chapitre II. Etude <i>in vivo</i> des effets de nouveaux photosensibilisateurs pour le traitement du cancer de la prostate par photothérapie dynamique	202
Conclusion et Perspectives.....	204
Références bibliographiques.....	211
Table des illustrations	227
Table des tableaux	233
Table des matières	234
Publications élaborées au cours de la thèse	240



LISTE DES ABREVIATIONS

3-MA	3-méthyladénine
5-ALA	Acide 5-aminolévulinique
5-FU	5-Fluorouracil

A

AA	Acide arachidonique
ABTS	2,2-azino-di-[3-éthylbenzothiazoline sulfonate]
ADN	Acide désoxyribonucléique
AGPI	Acide gras polyinsaturé
AIF	Apoptosis-inducing factor
AINS	Anti-inflammatoire non stéroïdien
AJCC	American Joint Committee on Cancer
Ambra	Activating molecule in Beclin 1 related autophagy protein
AMH	Hormone de régression müllérienne
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
AMPK	5'-AMP-activated protein kinase
ANT	Adénine nucleotide translocase
AP-1	Activator protein 1
Apaf-1	Apoptosis protease-activating factor-1
AR	Récepteurs aux androgènes
ARE	AR-response element
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine triphosphate
AZ	Antizyme
AZI	Inhibiteur d'antizyme



B

BAFF	B-cell activating factor
Bcl-2	B-cell leukemia/lymphoma 2-like proteins
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BH	Bcl-2 homology
BIR	Baculovirus IAP Repeats
BPD	Benzoporphyrine
BPE	Extrait d'hypophyse bovine
BSA	Albumine sérique bovine

C

CaP	Cancer de la prostate
CARD	Caspase activation and recruitment domain
Caspase	Cysteiny l aspartate-specific protease
CBP	Protéine de liaison aux protéines CREB
CDK	Cyclin dependent kinase
CIS	Carcinome in situ
CL	Cardiolipine
COX	Cyclooxygénase
CpG	Cytosine-guanine rich dinucleotide
CRD	Cysteine rich domain
CREB	cAMP response element binding protein
CRPC	Cancer prostatique résistant à la castration
CSC	Cellules souches cancéreuses
CUGBP2	CUG triplet repeat, RNA-binding protein 2

D

DAPK	Death-associated protein kinase
DBD	Domaine de liaison à l'ADN
DCF	2'7'-dichlorofluorescine



DCFDA	2'7'-dichlorofluoresceine diacétate
DD	Death domain
DED	Death effector domain
Deptor	DEP domain-containing mTOR interacting protein
DFMO	A-difluorométhyl-ornithine
DHT	Dihydrotestostérone
Diablo	direct IAP binding protein with low pI
DIG	Digoxigénine
Dios	Diosgénine
DISC	Death inducing signaling complex
DMSO	Diméthylsulfoxyde

E

ECBU	Examen cytobactériologique des urines
EDTA	Acide éthylène diamine tétraacétique
EGF	Epidermal Growth Factor
EI	Electroporation irréversible
EIA	Enzyme ImmunoAssay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
endoG	Endonucléase G
ERK	Extracellular signal regulated kinase
ESCRT	Endosomal sorting complex required for transport

F

FADD	Fas-associated death domain
FC	Facteur de croissance
FC-R	Récepteur de facteur de croissance
FGF	Fibroblast Growth Factor
FLIP	Flice-inhibitory protein



G

GAP	GTPase activating protein
GFP	Green fluorescent protein
GPC-1	Glypican-1
GR	Glucocorticoïdes

H

HAT	Histone acétyltransférase
HBP	Hyperplasie bénigne de la prostate
HEPES	N-[2-hydroxyéthyl]pipérazine-N'-[2-éthanesulfonique]
HES	Hématoxyline-Eosine-Safran
HIFU	Ultrasons focalisés de haute intensité
Hp	Hématoporphyrine
HpD	Hématoporphyrine dérivée
HPLC	Chromatographie liquide haute performance
HPV	Human Papilloma Virus
HRP	Horseradish peroxidase
HY	Hypéricine

I

IAP	Inhibitor Apoptosis Protein
IC	Conversion interne
Ig	Immunoglobuline
IGF	Insulin-like Growth Factor
IKK	I κ B kinase
IL	Interleukine
INCa	Institut National du Cancer
InVS	Institut de Veille Sanitaire
IP	Iodure de propidium
IRM	Imagerie par Résonance Magnétique
ISC	Transition intersystème



J

JC-1	5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimidazole carbocyanide iodide
JNK	c-Jun NH2-terminal kinase

L

LAMP	Lysosomal-associated membrane protein
LBD	Domaine de liaison au ligand
LHRH	Hormone de libération de la lutéinostimuline
LITT	Thermothérapie laser interstitielle
LKB	Liver kinase B
LOX	Lipoxygénase

M

MAC	Mitochondrial apoptosis-induced channel
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKK	MAP kinase kinase
MAPKKK	MAP kinase kinase kinase
Mda-7	Melanoma differentiation-associated gene 7
MGBG	Méthylglyoxal-bis-guanyldrazone
miR	Micro-ARN
MKK	MAP kinase kinase
mLST8	mTOR associated protein LTS8 homolog
MMP	Matrix Metalloproteinase
MP	Membrane plasmique
MR	Minéralo-corticoïdes
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MTORC1	Mechanistic target of rapamycin complex 1
mTPHC	Méso-tétra-hydroxyphénylchlorine
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide



N

NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NF-κB	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NIK	NF-κB-inducing kinase
NLS	Signal de localisation nucléaire
NO	Oxyde nitrique
NOS	Nitrique synthase
NPe6	Mono-L-aspartyl chlorine 6
NTD	Domaine N-terminal

O

OCD	Ornithine décarboxylase
-----	-------------------------

P

PA	Polyamine
PAO	Polyamine oxydase
PARP	Poly-ADP-Ribose-polymerase
PAS	Phagophore assembly site
PBS	Phosphate buffer saline
Pc4	Phtalocyanine 4
PDD	Photo-diagnostic dynamique
PDK1	Phosphoinoitide-dependent kinase 1
PDT	Photothérapie dynamique
PE	Phosphatidyl-éthanolamine
PF	Photofrin®
PG	Prostaglandine
PGHS	Prostaglandine endopéroxyde G/H synthase
PGT	Transporteur des prostaglandine
PI3K	Phosphatidyl inositol-3 kinase



PIP2	Phosphatidyl-inositol 4-5-biphosphate
PIP3	Phosphatidyl-inositol 3-4-5-triphosphate
PKA	Protéine kinase A
PKC	Protéine kinase C
PLA2	Phospholipase A2
PPAR	Peroxisome proliferator activated receptor
PpIX	Protoporphyrine IX
PpIX-dSd	Protoporphyrine IX couplée à deux molécules de spermidine
PpIX-dSm	Protoporphyrine IX couplée à deux molécules de spermine
PRAS40	Proline-rich Akt substrate of 40 KDa
PS	Photosensibilisateur
PSA	Antigène spécifique de la prostate
PSMA	Prostate specific membrane antigen
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTP	Permeability Transition Pore
PTS	Système de transport des polyamines
PTS	Système de transport des polyamines
PVDF	Polyvinylidène fluorure

R

Rab-SNARE	Soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor
Raptor	Regulatory associated protein of mTOR
RE	Réticulum endoplasmique
Rheb	Ras homolog enriched in brain
RITA	Radiofrequency Interstitial Tumor Ablation
ROS	Reactive oxygen specie
RTK	Récepteur tyrosine kinase



S

SAM-DC	S-adénosylméthionine décarboxylase
SAPK	Stress-activated protein kinase
SDS-PAGE	SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
SIMP	Soluble inter-membrane mitochondrial protein
siRNA	Small interfering RNA
Smac	Second mitochondria-derived activator of caspases
SSAT	Spermidine/spermine Acétyltransférase
SVF	Sérum de veau foetal

T

TBE	Tris-Borate-Acétate
TBS	Tris-buffered saline
TCC	Carcinome transitionnel superficiel résistant
TGF	Transforming growth factor
THBP	Tertiary-butyl hydroperoxide
TNF	Tumor necrosis factor
TR	Toucher rectal
TRADD	TNF receptor associated death domain
TSC	Tuberous sclerosis protein
TX	Thromboxane

U

ULK	UNC-51-like kinase
UVRAG	UV radiation-associated gene protein

V

VDCA	Canaux ioniques voltage dependants
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VPN	Valeur prédictive négative
VPP	Valeur prédictive positive
VTP	Vascular Targetting Therapy



INTRODUCTION



Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez l'homme de plus de 50 ans dans les pays industrialisés. En France, le nombre de nouveaux cas diagnostiqués était, en 2010, de 71 577 cas (taux standardisé [monde] 128,8 pour 100 000) devant les cancers du poumon (27 000 cas) et les cancers colo-rectaux (21 000 cas). En dépit d'avancées considérables dans le traitement du cancer de la prostate, les effets secondaires des thérapies actuellement utilisées restent très fréquents du fait du manque de préservation des tissus prostatiques sains bordant la tumeur. De plus, la résistance aux thérapies anti-tumorales mais également l'importance des cas de récurrence restent des problèmes majeurs rencontrés. Pour pallier à ces problèmes, la recherche médicale tend à développer des méthodes de thérapie focale du cancer de la prostate et également, de comprendre et contrecarrer les phénomènes de résistance aux traitements qui peuvent se mettre en place.

Dans le cadre de cette thérapie focale du cancer de la prostate, la photothérapie dynamique (PDT) repose sur l'utilisation de molécules photosensibles appelées photosensibilisateurs (PS). Après avoir ciblé spécifiquement les cellules cancéreuses, ces PS sont activés par la lumière et vont induire la production d'espèces hautement toxiques pour les cellules cancéreuses à l'origine de leur destruction. Ces effets oxydatifs sont donc confinés aux zones ayant à la fois accumulé le PS et ayant été soumises à l'irradiation.

Dans un cadre de chimie verte et de valorisation des ressources renouvelables, la ligne directrice du Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de Limoges est de synthétiser de nouveaux PS naturels capables de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses afin d'optimiser l'effet thérapeutique.

Envisager le ciblage tumoral par ces PS signifie aborder la distinction d'une cellule saine d'une cellule cancéreuse. Une des caractéristiques propres aux cellules cancéreuses est leur capacité de prolifération accrue et donc leur besoin plus important en polyamines (PA), éléments naturellement présents dans l'organisme et indispensables à la division cellulaire. En s'appuyant sur le fait que les cellules cancéreuses présentent un système de capture des PA davantage activé que les cellules saines, le laboratoire a mis en place le couplage d'un PS à des PA. Envisager les PA comme un outil de vectorisation d'une drogue anti-tumorale repose sur la théorie du cheval de Troie : utiliser un élément indispensable à la survie des cellules tumorales pour lui faire accumuler le PS responsable de leur mort.

A cette démarche s'ajoute le choix de la molécule thérapeutique permettant de briser la corrélation classique entre efficacité thérapeutique et toxicité associée pour l'organisme. C'est pour cela que le photosensibilisateur choisi est la protoporphyrine IX (PpIX). Il s'agit d'un PS largement étudié, naturellement présent au sein de l'organisme du fait de son implication dans la synthèse de l'hème et donc de l'hémoglobine.

Ainsi, les capacités anti-cancéreuses de ces photosensibilisateurs nouvellement synthétisés que sont la protoporphyrine IX dispermidinée et la protoporphyrine IX disperminée ont été évaluées *in vitro* et *in vivo*.

L'intérêt de la vectorisation des PS par les polyamines quant aux ciblage des cellules tumorales a été évalué : la photo-toxicité de la PpIX vectorisée sous ses deux formes (couplée à deux molécules de spermidine ou de spermine) est comparée à la celle de la PpIX seule dans deux modèles. Le premier consiste à évaluer les différences de photo-toxicité des trois photosensibilisateurs au sein de deux lignées différant par leur niveau d'expression des transporteurs des polyamines (la lignée ovarienne de hamster CHO et la lignée CHO-MG mutée pour ces transporteurs). Ce modèle permet de mettre en évidence l'importance de ces transporteurs quant à la capture des PS vectorisés. Le second modèle repose sur l'étude de ces photo-toxicités dans trois lignées cancéreuses prostatiques humaines (PC-3, DU-145 et LNCaP) en comparaison à une lignée prostatique humaine saine (RWPE-1). Ce second modèle permet de dévoiler une meilleure efficacité



des PS au sein des lignées cancéreuses et d'identifier une dose de PS capable de détruire les cellules cancéreuses tout en préservant les cellules saines.

L'un des principaux thèmes de recherche en cancérologie et notamment dans le cadre de la PDT est la recherche de nouvelles molécules thérapeutiques capables de stopper la prolifération tumorale. Dans ce but, deux stratégies thérapeutiques sont généralement mise en place : le blocage du cycle cellulaire et l'induction du processus de mort cellulaire programmée ou apoptose.

Dans cette étude, des expérimentations *in vitro* ont permis d'étudier les effets de la photoactivation des deux PS d'intérêt dans les trois lignées cancéreuses prostatiques humaines et notamment leurs effets sur le cycle cellulaire et l'apoptose. Les études menées ont permis également de caractériser les acteurs moléculaires impliqués dans l'apoptose induite et d'identifier les voies de transduction du signal activées par la PDT. Afin également de mieux appréhender les mécanismes de résistance à l'apoptose pouvant se mettre en place, deux voies largement connues pour leur propriétés anti-apoptotiques ont été étudiées : la voie de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et la voie de l'autophagie.

Enfin, les effets des deux nouveaux PS ont été étudiés grâce à des expérimentations *in vivo* basées sur les xénogreffes de cellules cancéreuses prostatiques humaines à des souris immuno-déprimées. Ces recherches ont permis de déceler une différence d'efficacité des deux PS, faisant de la PpIX-dSd un meilleur agent anti-cancéreux *in vivo*.

Préalablement à cette partie expérimentale, une partie bibliographique permettra de présenter le contexte pathologique qu'est le cancer de la prostate, les principes de cette nouvelle thérapie focale qu'est la photothérapie dynamique ainsi que les voies généralement induites par les thérapies anticancéreuses que sont l'apoptose, la voie de la cyclooxygénase-2 et l'autophagie, ces deux dernières voies étant connues comme inductrice d'une résistance aux traitements.



PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE



Chapitre I. Le cancer de la prostate

I.1. La prostate

I.1.1. Localisation et fonctions de la prostate

La prostate est une glande faisant partie de l'appareil reproducteur masculin. Elle est située dans la cavité pelvienne, sous la vessie, en avant du rectum. Elle entoure le canal de l'urètre, confluent des voies urinaires et spermatiques, qui permet l'évacuation de l'urine pendant la miction et le transport du sperme pendant l'éjaculation (**Figure I-1**).

La prostate, recouverte d'une couche de tissu conjonctif appelée capsule de la prostate, est constituée de 3 types cellulaires différents, chacun répondant à une fonction particulière de la glande:

- Les cellules fibreuses permettant le maintien de la structure de la glande.
- Les cellules musculaires formant 2 sphincters : lisse et strié. Le sphincter interne formé de fibres musculaires lisses entoure la partie supérieure de l'urètre. Sa tonicité empêche l'écoulement spontané de l'urine provenant de la vessie. Le sphincter externe formé de fibres musculaires striées comprend un anneau à la partie inférieure de l'urètre prostatique, et une extension en forme de bouclier sur les faces antérieure et antéro-latérales de la prostate. Il est responsable de l'acte volontaire de la miction.

Les cellules glandulaires responsables de 10 à 30% de la production de liquide séminal, le reste étant produit par les vésicules séminales, glandes accessoires appendues à la prostate. Ce liquide clair et riche en protéines et minéraux assure le maintien et la nutrition des spermatozoïdes.

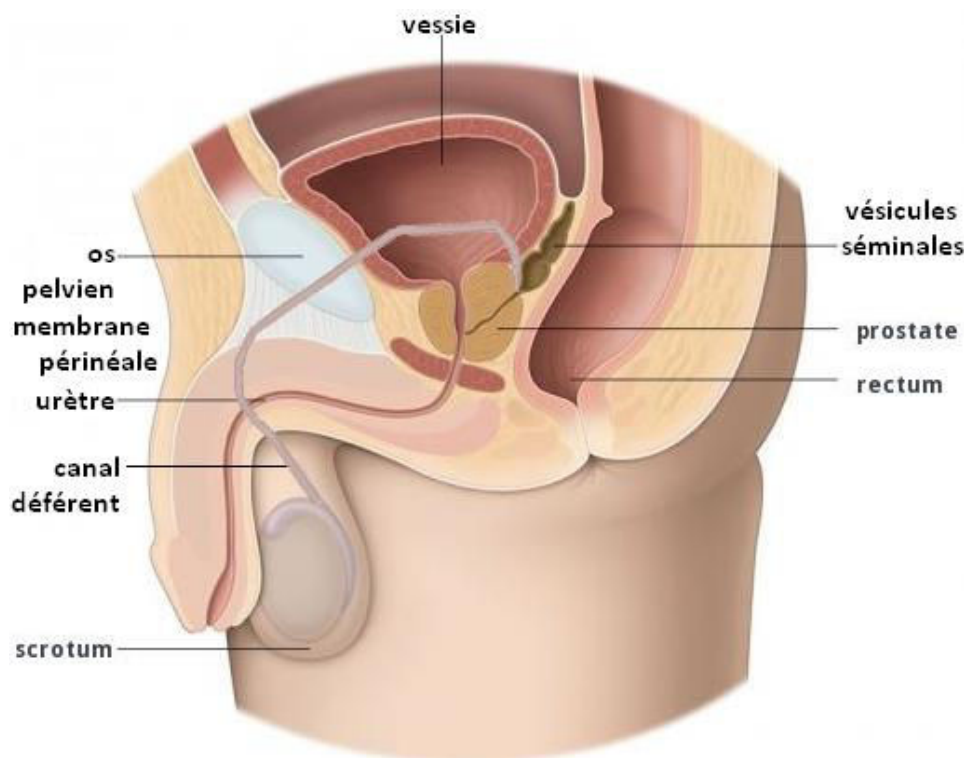


Figure I- 1 - Localisation de la prostate.

La prostate, située sous la vessie et en avant du rectum, fait partie de l'appareil reproducteur masculin. Elle entoure le canal de l'urètre, confluent des voies urinaires et spermatiques, et présente des glandes accessoires, les vésicules séminales.



I.1.2. Structures de la prostate

D'un point de vue histologique, la prostate comporte une cinquantaine de glandes tubulo-alvéolaires formée d'un épithélium accolé à une lame basale et maintenue par un stroma conjonctif (**FIGURE I-2**).

L'épithélium glandulaire est formé par des cellules sécrétrices de hauteur variable bordant la lumière du stroma. Ces cellules permettent la sécrétion de substances (phosphatases acides et alcalines, acide citrique, inositol, zinc, magnésium, acides gras libres, cholestérol, lysozyme, polyamines telles que la spermine et la spermidine) facilitant la mobilité des spermatozoïdes. On parle de sécrétion mérocrine (exocytose des grains de sécrétion au pôle apical de la cellule en respectant la membrane cellulaire) ou apocrine (les grains de sécrétion sont entourés de la membrane plasmique et entraînent avec eux le pôle apical de la cellule). Ces cellules sécrétrices possèdent à leurs membranes des récepteurs aux androgènes : elles sont dites hormono-dépendantes c'est-à-dire sous le contrôle des hormones masculines et notamment de la testostérone. Au niveau de cet épithélium, sont retrouvées également des cellules basales dites de remplacement et des cellules neuroendocrines, peu nombreuses. Ces dernières produisent des neuropeptides spécifiques qui stimulent et régulent les fonctions sécrétrices des cellules sécrétrices.

Le compartiment stromal, constitué de fibroblastes, de cellules musculaires, de macrophages et de vaisseaux sanguins et lymphatiques, sécrète des facteurs de croissance participant au renouvellement de l'épithélium et à son activité sécrétoire. Dans la lumière des tubulo-acini, on observe la présence relativement fréquente de petits corps sphériques formés de lamelles concentriques de glycoprotéines, appelés corps de Robin (ou sympexions). Chez l'homme, ces sympexions ont tendance à se calcifier à partir de 40 ans. On parle de calcul ou lithiase prostatique.

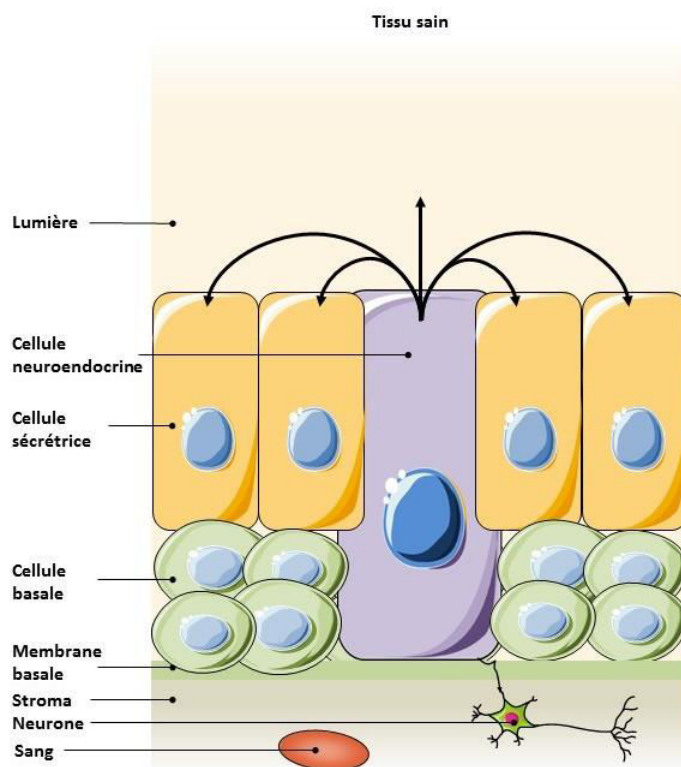


Figure I- 2 - Structures cellulaires de la prostate.

Les glandes tubulo-alvéolaires de la prostate sont formées d'un épithélium constitué de cellules sécrétrices et de quelques cellules neuroendocrines. Cet épithélium est bordé par des cellules basales, accolé à la membrane basale et soutenu par un stroma conjonctif. D'après Bok et al., 2002 (1).



La prostate comporte 3 zones distinctes susceptibles d'être sujettes à plusieurs pathologies (**Figure I-3**) :

- La zone périphérique qui est la plus grande zone de la prostate et la plus proche du rectum est palpable par le médecin par toucher rectal (TR). La majorité des tumeurs (75%) surviennent dans cette zone.
- La zone transitionnelle, située entre les 2 autres zones, entoure l'urètre. Avec le vieillissement, son volume augmente jusqu'à ce qu'elle devienne la plus grande zone de la prostate : c'est ce qu'on appelle l'hyperplasie bénigne de la prostate (HBP).
- La zone centrale située devant la zone transitionnelle est la plus éloignée du rectum. Ainsi, les tumeurs touchant cette zone ne peuvent être détectées lors d'un toucher rectal.

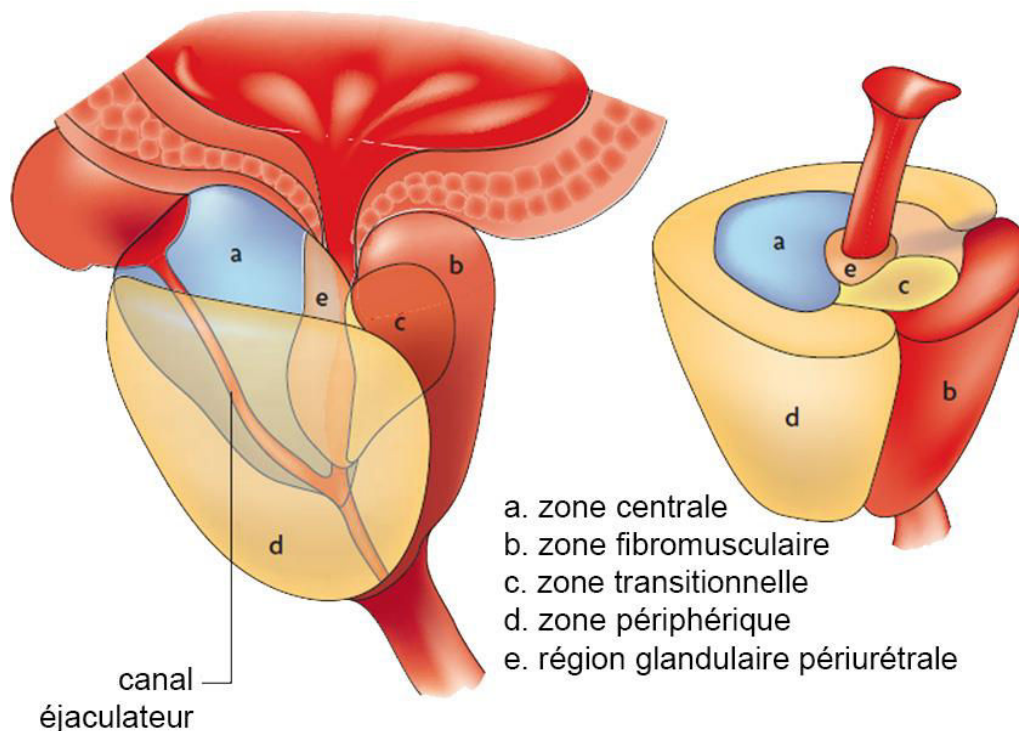


Figure I- 3 - Les différentes zones de la prostate.

De la périphérie vers le centre, la prostate est composée de 3 zones principales distinctes : périphérique, transitionnelle et centrale. D'après De Marzo et al., 2007 (2).

La localisation et les fonctions de la prostate permettent d'expliquer les effets secondaires (dysfonction érectile, anéjaculation et incontinence) liés aux pathologies touchant cet organe mais surtout justifient l'importance de développer des thérapies n'influant pas sur la fonctionnalité de l'organe.

I.1.3. Pathologies de la prostate

La glande prostatique est susceptible d'être sujette à plusieurs pathologies : prostatite, adénome ou hyperplasie bénigne de la prostate (HBP) ou encore cancer de la prostate.



La prostatite

La prostatite est une inflammation de la prostate qui peut être due à une infection bactérienne. Il en existe deux formes : la prostatite aiguë due, dans 80% des cas, à une infection par *Escherichia coli* et la prostatite chronique, elle aussi, souvent due à la prolifération d'*Escherichia coli*, et plus rarement de *Mycobacterium tuberculosis* (en cas de tuberculose urogénitale). Un examen cyto bactériologique des urines (ECBU) et un antibiogramme permettent la numération des leucocytes et l'identification des germes responsables afin d'effectuer un traitement par antibiotiques. Les classes les plus utilisées d'antibiotiques sont les fluoroquinolones et les céphalosporines de troisième génération.

L'hypertrophie bénigne de la prostate

L'hypertrophie bénigne de la prostate (HBP), appelée aussi adéno-myo-fibrome prostatique, est une affection non cancéreuse d'évolution lente : elle débute progressivement chez l'adulte à partir de 30 ans mais ne s'exprime en général qu'à partir de 40 ans (18% des hommes) pour augmenter en fréquence avec l'âge (plus de 50% des hommes de plus de 70 ans). L'âge moyen de découverte clinique de l'adénome est de 65 ans chez le sujet européen. En France, plus de 6 millions d'hommes sont concernés par l'HBP. L'HBP est liée à l'hypertrophie progressive des structures glandulaires constituant la prostate, particulièrement dans la partie transitionnelle entourant l'urètre. Le volume de la prostate se trouvant augmenté, elle exerce une pression sur l'urètre et la vessie engendrant ainsi des troubles urinaires. Les alpha1-bloquants, antagonistes des récepteurs alpha 1 adrénergiques, constituent le choix le plus courant pour le traitement initial des HBP : ils permettent de détendre les muscles lisses de la prostate et du col de la vessie, diminuant ainsi le blocage de l'écoulement de l'urine.

Le cancer de la prostate

Le cancer de la prostate (CaP), comme tout cancer, est caractérisé par une prolifération incontrôlée des cellules épithéliales de cette glande, qui se multiplie de façon anarchique pour former une tumeur maligne capable de s'étendre localement et éventuellement de migrer hors de la prostate, essentiellement vers les ganglions lymphatiques et les os, entraînant ainsi des métastases. Depuis plusieurs décennies, le cancer de la prostate se situe au 1^{er} rang des cancers incidents chez l'homme guidant ainsi la recherche vers le développement de nouvelles thérapies plus bénéfiques pour le patient, tant en matière de performance que de qualité de vie.

I.2. Le cancer de la prostate

I.2.1. L'épidémiologie du cancer de la prostate

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez l'homme de plus de 50 ans dans les pays industrialisés. En France, le nombre de nouveaux cas diagnostiqués était, en 2011, de 53 913 cas (taux standardisé [monde] 97,7 pour 100 000) devant les cancers du poumon (27 000 cas) et du côlon-rectum (21 000 cas) (3). Selon le rapport de l'Institut National du Cancer (INCa) et de l'Institut de Veille Sanitaire (InVS) de 2015, le nombre de décès s'élève à 8 893 en 2011 et le taux d'incidence de ce cancer présente une augmentation de l'ordre de 8,5% par an entre 2000 et 2005. Cette augmentation de l'incidence est la conséquence de l'effet combiné du vieillissement de la population et des changements de pratiques diagnostiques avec la généralisation du dépistage individuel par toucher rectal ou encore par dosage biologique du PSA (Prostate Specific Antigen).



La survenue du cancer de la prostate est tardive. En effet, le nombre de cas incidents est ainsi très faible avant 50 ans (<0,5% des cas incidents), augmente progressivement avec l'âge (la classe 70-74 ans étant la plus représentée avec 21% des cas incidents) et diminue ensuite (18% pour la classe 75-79 ans et 16% pour les plus de 80 ans) (**Figure I-4**).

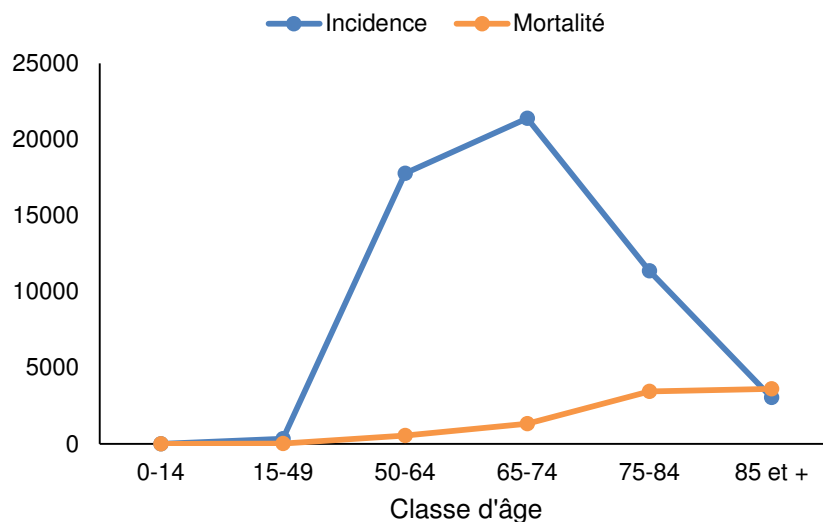


Figure I- 4 - Nombre de nouveaux cas et de décès en 2011 en France métropolitaine par classe d'âge. (D'après les données de l'INCa et de l'InVS - Projection de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine en 2015. Rapport technique)

I.2.2. Les facteurs de risque

Malgré les progrès qui ont permis de mieux comprendre les mécanismes de développement des cancers, les causes du cancer de la prostate ne sont actuellement pas connues. Cependant, des facteurs de risque qui semblent favoriser un cancer de la prostate ont été identifiés.

I.2.2.1. Les facteurs de risque établis

Comme dit précédemment, l'âge est le facteur de risque le plus important. Le cancer de la prostate est exceptionnel avant l'âge de 50 ans et son incidence augmente avec l'âge.

Aussi, dans certains cas, les antécédents familiaux peuvent être considérés comme un facteur de risque de cancer de la prostate. Selon l'histoire familiale, ce cancer peut survenir sous différentes formes :

- forme sporadique, c'est-à-dire non héréditaire. C'est la forme la plus répandue.
- forme familiale, c'est-à-dire qu'il existe au moins deux cas de cancer de la prostate chez des apparentés du premier degré (père, frère) ou du second degré (grand père, oncle). Cette forme familiale représente 20% des cancers de la prostate.
- forme héréditaire qui se définit par l'existence d'au moins 3 cas de cancer de la prostate chez des apparentés du premier degré ou du second degré, ou de 2 membres de la famille diagnostiqués avant l'âge de 55 ans. Cette forme représente 5 % des cancers de la prostate. A ce jour, plusieurs gènes de prédisposition au cancer de la prostate ont été étudiés mais aucune preuve les impliquant de façon certaine dans cette prédisposition n'a pu être mise en évidence de façon concluante.



Enfin, l'origine ethnique et géographique peut jouer un rôle dans la prédisposition au cancer de la prostate. De nombreuses études ont montré que le nombre de cas de cancers de la prostate est beaucoup plus important dans les pays d'Europe du Nord et d'Amérique du Nord par rapport aux pays d'Asie du Sud-Est où l'on constate une faible incidence de ce cancer (**Figure I-5**).

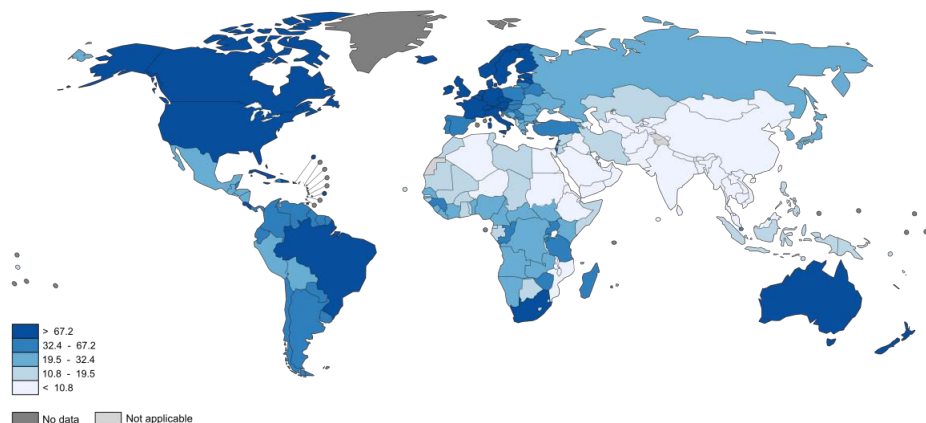


Figure I- 5 - Taux d'incidence du cancer de la prostate estimés dans le monde en 2012.

(Taux estimés normalisés selon l'âge pour 100 000 hommes). D'après Globacan 2012 – données de l'Organisation Mondiale de la Santé)

I.2.2.2. Les facteurs de risque et les facteurs protecteurs probables

À ce jour, aucun résultat certain n'existe pour permettre de donner des conseils précis aux patients quant aux conditions de vie à adopter pour minimiser le risque de développer un cancer de la prostate : l'influence des facteurs environnementaux reste mal établie et extrêmement complexe. Cependant, selon les méta-analyses réalisées par le WCRF/AICR en 2007, il reste à noter qu'une consommation importante de lait et de produits laitiers, pouvant contribuer à des apports élevés en calcium, est associée de manière probable à une diminution du risque de cancer du côlon-rectum mais à une augmentation du risque de cancer de la prostate. Aucune association, probable ou convaincante, n'a été rapportée entre la consommation de lait ou de produits laitiers et les autres localisations de cancers. Enfin, une relation probable a été établie entre une diminution du risque de cancer de la prostate et la consommation de fruits et légumes contenant du sélénium (oligoélément présent dans les céréales complètes, la viande, les légumes secs, les œufs, le poisson...) ou du lycopène (caroténoïde présent dans les tomates, la pastèque, le pamplemousse...).

I.2.3. L'anatomopathologie

Il existe de nombreuses variantes morphologiques d'adénocarcinomes prostatiques, des formes rapidement métastatiques mais très rares (adénocarcinome à cellules transitionnelles ou carcinomes à petites cellules) ainsi que de tumeurs primitives non épithéliales (sarcomes). Cependant, la majorité des cancers de la prostate sont des adénocarcinomes localisés au niveau de l'épithélium glandulaire, touchant préférentiellement les cellules sécrétrices. On parle de cancer localisé ou capsulaire : dans 70% des cas, la tumeur se développe préférentiellement au niveau de la zone périphérique contre 20% au niveau de la zone transitionnelle et 10% au niveau de la zone centrale. En cas de développement plus important de la tumeur, celle-ci peut atteindre la graisse péri-prostatique, les vésicules séminales pour ensuite former des métastases à distance. Les sites métastatiques les plus connus sont les ganglions lymphatiques (ganglions inguinaux et ganglions de l'abdomen) et les os (le bassin, le rachis, les côtes et le sternum). On parle de cancer non localisé ou extra-capsulaire.



I.2.3.1. La classification TNM

La classification « TNM » permet d'évaluer les caractéristiques d'un cancer selon des critères de propagations anatomiques locales, régionales et métastatiques à distance. Elle prend en compte la combinaison d'indicateurs de classement représentés par les lettres T (taille et degré d'extension de la Tumeur initiale), N (nombre et emplacement des Nodes ou ganglions lymphatiques régionaux atteints) et M (degré de propagation des Métastases).

La lettre **T** est l'indicateur LOCAL de la taille et de l'extension de la tumeur primitive (**Tableau 1**).

T	Tumeur primitive (taille dans le plus grand diamètre)	
Tx	Tumeur primitive non évaluée	
T0	Tumeur primitive non retrouvée	
T1	<p>Tumeur non détectable par toucher ou par imagerie</p> <ul style="list-style-type: none"> - T1a : tumeur occupant moins de 5% du tissu réséqué (la découverte est réalisée au cours d'une ablation d'adénome) - T1b : tumeur occupant plus de 5% du tissu réséqué - T1c : tumeur découverte sur une biopsie prostatique en raison d'une élévation du taux des PSA 	
T2	<p>Tumeur limitée à la prostate</p> <ul style="list-style-type: none"> - T2a : tumeur atteignant la moitié d'un lobe ou moins - T2b : tumeur atteignant plus de la moitié d'un lobe mais sans atteindre en totalité les 2 lobes - T2c : tumeur atteignant les 2 lobes 	
T3	<p>Tumeur étendue au-delà de la capsule prostatique</p> <ul style="list-style-type: none"> - T3a : extension extra capsulaire uni- ou bilatérale, incluant l'extension au col vésical - T3b : extension aux vésicules séminales uni- ou bilatérale 	
T4	<p>Tumeur fixée ou atteignant d'autres structures que les vésicules séminales : vessie, sphincter, rectum, muscles releveurs de l'anus ou paroi pelvienne</p>	

Tableau 1 - La classification TNM – La lettre T.

T1 : la tumeur est trop petite pour être détectée au toucher ou en imagerie. T2 : la tumeur est limitée à la prostate. T3 : la tumeur est étendue aux vésicules séminales. T4 : la tumeur est étendue aux autres organes. Données de l'INCa.



La lettre N est l'indicateur du nombre et du volume des Nodes ou ganglions lymphatiques atteints au niveau des aires classiques du drainage lymphatique de la prostate. Son évaluation comporte :

- Nx : Pas d'évaluation du statut ganglionnaire
- N0 : Aucun ganglion métastatique des aires de voisinage mis en évidence
- N1 : Atteinte ganglionnaire pelvienne
- N1 mi : Métastase ganglionnaire < 0,2 cm (optionnel)

L'évaluation de **la lettre M** est l'indicateur du degré de propagation des Métastases à distance (**Tableau 2**).

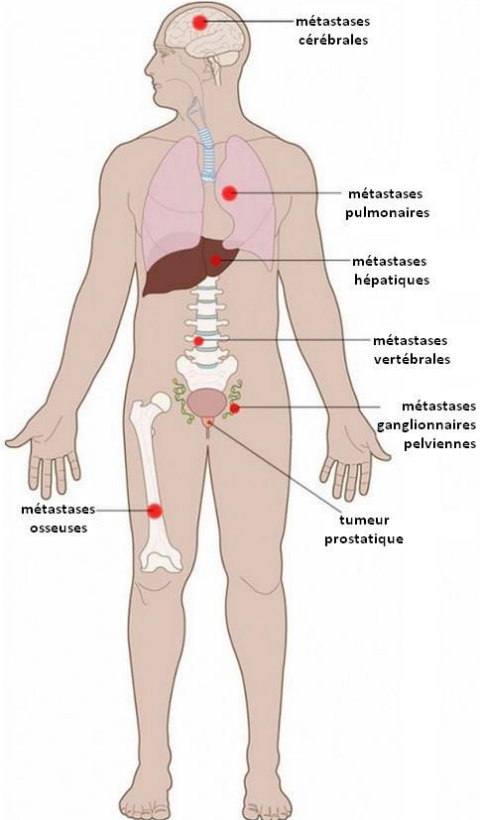
Mx	Pas d'évaluation du statut des métastases	
M0	En cas d'absence de métastases	
M1	<p>En présence de métastases à distance, quelles qu'en soient les localisations ou la taille :</p> <ul style="list-style-type: none"> - M1a : atteinte des ganglions non régionaux - M1b : atteinte osseuse - M1c : autres sites (foie, poumon...) 	

Tableau 2 - La classification TNM – la lettre M.

Sites préférentiellement métastasés en cas de cancer de la prostate. Le cancer prostatique peut s'étendre au niveau des ganglions non régionaux, puis au niveau osseux pour enfin atteindre d'autres sites tels que le foie, les poumons ou le cerveau. Données de l'INCa.

En combinant les critères TNM, l'Institut National du Cancer propose une stadification aboutissant à un classement du cancer entre le stade 1 et le stade 4 (**Tableau 3**). Cette évaluation permet ainsi de prendre en compte simultanément le degré d'envahissement de la tumeur ainsi que la présence et la localisation de métastases.



Stade 1	T1-N0-M0 ou T2-N0-M0	Cancer de la prostate localisé.
Stade 2	T3-N0-M0 ou T4-N0-M0	Cancer de la prostate localement avancé : la tumeur s'est étendue hors de la capsule prostatique mais sans atteinte des ganglions lymphatiques ni métastase à distance.
Stade 3	tout T-N1-M0	Cancer de la prostate avec atteinte ganglionnaire pelvienne : la tumeur a atteint les ganglions lymphatiques sans métastases dans des organes à distance.
Stade 4	tout T-tout N-M1	Cancer de la prostate métastatique.

Tableau 3 – Les stades de cancer de la prostate selon la classification TNM.

Cette classification permet de rendre compte du degré d'envahissement de la tumeur ainsi que de la présence et de la localisation de métastases. Données de l'INCa.

I.2.3.2. Le score de Gleason

Le diagnostic d'adénocarcinome est affirmé par une analyse des cellules des tissus prostatiques prélevés lors d'une biopsie (histologie ou examen anatomo-cytopathologique). Cet examen consiste à insérer une aiguille par voie transrectale pour obtenir plusieurs prélèvements écho-guidés (échos produits par un faisceau d'ultrasons permettant l'obtention d'une image échographique de la prostate et le guidage de l'aiguille). L'examen des cellules se fait par lecture humaine de lames et utilisation d'un référentiel de description. Le degré de différenciation des cellules est apprécié par le score de Gleason. La classification de Gleason est fondée sur le degré de différenciation de la tumeur, coté du grade 1 à 5 (4):

- Stade 1 : les cellules cancéreuses prostatiques différenciées sont semblables aux cellules prostatiques saines. Néanmoins, des nodules de taille moyenne peuvent être identifiés du fait de la prolifération anarchique des cellules cancéreuses induisant ainsi la formation de glandes simples arrondies ou ovales, étroitement regroupées mais restant séparées.
- Stade 2 : l'aspect est similaire au stade 1, les nodules sont bien circonscrits avec cependant une infiltration minime des tissus avoisinants.
- Stade 3 : les glandes de taille typiquement plus petite que dans les grades 1 et 2, sont séparées et s'insinuent entre les glandes non tumorales, de forme et de taille irrégulières.
- Stade 4 : les glandes sont encore plus petites et fusionnées, ou sont mal définies avec une lumière glandulaire mal formée. On parle également de glandes cribriformes à bordures irrégulières, ou glandes fusionnées faites de cellules claires.
- Stade 5 : l'absence de différenciation glandulaire, la présence de plages massives, traversées ou cellules isolées, les aspects de comédocarcinome avec nécrose centrale entourée de structures papillaires, cribriformes ou solides représentent le dernier stade de classification.

Enfin, le score de Gleason, coté de 2 à 10, est la somme des deux grades le plus fréquemment représentés dans la tumeur analysée.

I.2.3.3. Le PSA (Prostate Specific Antigen) : un marqueur anatomopathologique spécifique du cancer de la prostate

Le PSA est une glycoprotéine de la famille des kallikréines produite uniquement par la prostate, qui joue un rôle dans la fluidification du liquide séminal. Le PSA peut être considéré comme un marqueur biologique de « l'activité prostatique ». Son taux sérique est augmenté en cas d'adénome prostatique, de prostatite et de cancer de la prostate.



Le PSA circulant est retrouvé sous 2 formes (5) : le PSA libre et le PSA complexé.

- Le PSA libre ou fPSA qui représente en moyenne 30% du PSA sérique total, possède une demi-vie de 12 heures, avec une élimination par voie rénale. Des isoformes du fPSA ont été décrites : le BPSA (fPSA associé à une Hypertrophie Bénigne de la Prostate), les Pro-PSA (précurseurs du fPSA) et le PSA intact (autre PSA inactif et intact).
- Le PSA complexé ou cPSA est composé de trois fractions :
 - le PSA-ACT (complexé à l' α 1-antichymotrypsine), qui en est la forme majeure et qui y est assimilé. Il représente 70% du taux total de PSA, possède une demi-vie longue avec une élimination inférieure à 1 ng/ml/j par voie hépatique. Le cPSA est la fraction du PSA qui augmente en cas de cancer.
 - le PSA-API (complexé à l' α 1-protéase), forme mineure dosée avec le PSA-ACT.
 - le PSA-A2M (complexé à l' α 2-macroglobuline) est une forme mineure. Il n'est pas dosé en routine car tous ses sites antigéniques sont masqués par l'A2M.

Comme décrit précédemment, la prostate est formée d'une couche de cellules sécrétrices. Ce sont ces dernières qui vont être à l'origine de la sécrétion de PSA. Cette couche étant bordée par une couche de cellules basales, le PSA produit est sécrété directement au niveau de la lumière. En cas de cancer de la prostate, cette seconde couche de cellules est détruite permettant ainsi au PSA un accès direct à la circulation sanguine (6) (**Figure I-6**). C'est pourquoi, le PSA, normalement retrouvé en très faible quantité dans le sang, peut être dosé par simple prise de sang : l'augmentation de son taux sérique pouvant ainsi être un biomarqueur du cancer de la prostate. Une valeur supérieure à 4 ng/ml est généralement considérée comme anormale mais cela dépend néanmoins de l'âge de la personne et de la taille de sa prostate.

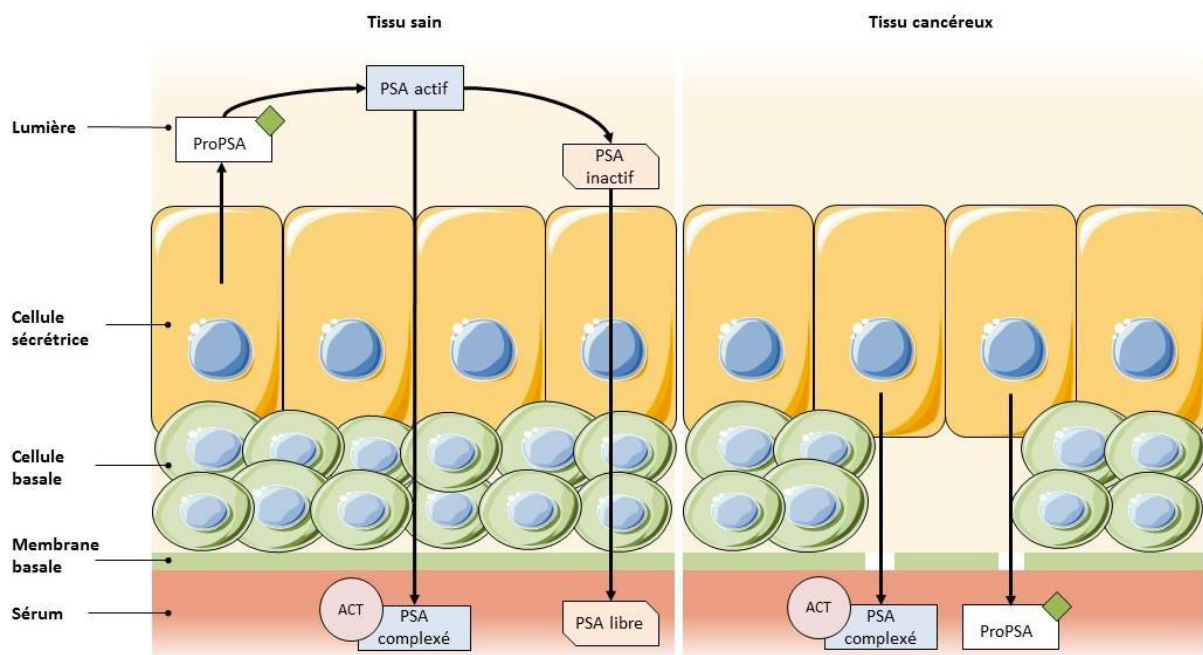


Figure I- 6 - Biosynthèse de l'Antigène Spécifique de la Prostate (PSA) dans l'épithélium prostatique sain en comparaison à l'épithélium prostatique cancéreux.

Les cellules sécrétrices saines, tapissées par les cellules basales et une membrane basale, sécrètent dans la lumière, le ProPSA qui va générer le PSA actif. Une fraction de ce PSA actif peut diffuser dans la circulation et rapidement se lier à l' α 1-antichymotrypsine (ACT) alors qu'une autre fraction va être lysée dans la lumière pour former le PSA inactif qui va pouvoir diffuser dans la circulation sanguine sous forme de PSA libre. En cas de CaP, la destruction de certaines cellules basales et de la membrane basale résulte de l'inhibition de la biosynthèse de PSA présente au niveau de la lumière, favorisant ainsi l'augmentation du taux sérique de proPSA et de PSA complexé. D'après Balk et al., 2003 (6)



Dans le cadre du dépistage du cancer de la prostate, la majorité des études s'accordent à dire que le PSA complexé est plus spécifique que le PSA total, à sensibilité égale, pour les valeurs de PSA total intéressantes en pratique clinique (2 à 10 ng/ml) (7). Ainsi, le National Comprehensive Cancer Network (NCCN) recommande depuis 2005 l'utilisation du PSA complexé en première intention au cours du dépistage en association au toucher rectal, comme alternative au dosage du PSA total. Lorsque la valeur du PSA est supérieure à 4 ng/ml, un cancer est diagnostiqué environ 3 fois sur 10 avec la biopsie prostatique de confirmation. En situation de dépistage individuel, la valeur prédictive positive (VPP) est de l'ordre de 30%, ce qui signifie que parmi les personnes qui ont un PSA total supérieur à 4 ng/ml, 3 sur 10 ont un cancer et 7 sur 10 n'en ont en réalité pas. Dans ce même cadre, la valeur prédictive négative (VPN) est de l'ordre de 90% : cela signifie que lorsque le PSA total est < 4 ng/ml, l'absence de cancer de la prostate est réelle dans 9 cas sur 10. L'intérêt de l'abaissement du seuil au-dessus duquel une biopsie est à proposer reste discuté. Cet abaissement augmenterait la sensibilité du test au détriment de sa spécificité. Cela conduirait à une augmentation du nombre de cas diagnostiqués, mais aussi à celle du nombre de biopsies négatives. La proportion de cancers considérés comme cliniquement non significatifs (de petit volume et de faible grade) dans les cancers diagnostiqués en supplément est mal déterminée.

I.2.3.4. Stadification multicritères AJCC (TNM, Score de Gleason et PSA)

Les facteurs pronostiques en matière de cancers de la prostate ne se réduisent pas aux seuls facteurs anatomiques du critère TNM mais peuvent également intégrer le « score de Gleason » (indicateur du degré de différenciation cellulaire des tissus prélevés) ainsi que le PSA (marqueur sanguin protéique, sécrété par la prostate dont l'augmentation peut indiquer la présence d'un cancer). L'American Joint Committee on Cancer (AJCC) propose une stadification qui combine TNM, score de Gleason et PSA (**Tableau 4**).

Stade	TNM	Score de Gleason	PSA (ng/mL)	Caractéristiques de la tumeur
1	T1 ou T2a-N0-M0	≤ 6	< 10	Localisée avec PSA et Gleason bas
2A	T1-N0-M0 T2a ou T2b-N0	≤ 6 7 ≤ 7	Entre 10 et 20 < 20 < 20	Localisée avec PSA ou Gleason élevés
2B	T2c-N0-M0 T1 ou T2-N0-M0	≥ 8	< 20	Etendue aux 2 lobes mais localisée. Localisée avec Gleason ou PSA très élevés
3	T3-N0-M0			Extension extra-capsulaire et/ou aux vésicules séminales
4A	T4-N0-M0			Extension aux organes adjacents
4B	tout T-N1-M0 tout T-tout N-M1			Extension aux ganglions régionaux ou avec métastases à distance

Tableau 4 - La stadification multicritères de L'American Joint Committee on Cancer (AJCC).

Ce classement prend en compte la classification TNM, le score de Gleason et le taux de PSA afin de déterminer les différents stades de cancer de la prostate.



I.3. La transformation de l'androgéno-dépendance à l'androgéno-indépendance

Le cancer de la prostate est un cancer dit hormono-sensible : sa croissance est stimulée par des hormones androgènes telles que la testostérone et la dihydrotestostérone (DHT). Ces dernières sont capables d'activer le récepteur aux androgènes (AR – Androgen Receptor) présent à la surface des cellules sécrétrices de la prostate. En revanche, certains cancers de la prostate sont dits hormono-résistants (ou résistants à la castration) lorsqu'un cancer réapparaît après prostatectomie ou évolue sous hormonothérapie. Les bases du passage de l'androgéno-dépendance vers l'androgéno-indépendance restent mal connues. Il est cependant démontré que les récepteurs AR jouent un rôle important dans ce phénomène.

I.3.1. Les récepteurs aux androgènes (AR)

L'action des androgènes sur l'expression génique passe par un capteur spécifique unique : le récepteur aux androgènes (AR). Ce facteur de transcription dépendant d'un ligand (la testostérone ou la dihydrotestostérone DHT) appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires stéroïdiens. Cette superfamille comprend le récepteur aux androgènes (AR), le récepteur à la progestérone (PR), le récepteur aux glucocorticoïdes (GR) et le récepteur aux minéralo-corticoïdes (MR). Ces récepteurs nucléaires stéroïdiens présentent une grande homologie d'organisation structurale comprenant quatre domaines différents : un domaine N-terminal (NTD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) formé par deux doigts de zinc, une région charnière comprenant le signal de localisation nucléaire et un domaine C-terminal impliqué dans la liaison du ligand (LBD). Des domaines d'activation de la transcription (AF1, AF2 et AF5) sont présents au niveau des domaines NTD et LBD (**Figure I-7**).

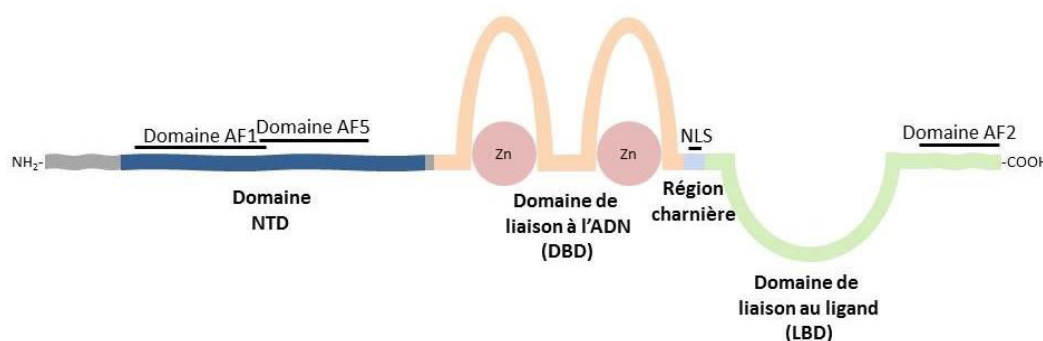


Figure I- 7 – Représentation schématique des principaux domaines fonctionnels du récepteur des androgènes.

Le récepteur AR possède 4 domaines distincts : un domaine N-terminal (NTD), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) formé par deux doigts de zinc, une région charnière comprenant le signal de localisation nucléaire (NLS) et un domaine C-terminal impliqué dans la liaison du ligand (LBD). Des domaines d'activation de la transcription (AF1, AF2 et AF5) sont présents au niveau des domaines NTD et LBD.

Bien que les domaines soient distincts, ils interagissent entre eux : tant que le domaine LBD n'est pas occupé par un androgène, il bloque la transactivation par le domaine NTD qui lui-même empêche la liaison avec l'ADN. Aussi, l'interaction entre les extrémités amine et carboxyl est nécessaire à la stabilisation du récepteur AR activé par un androgène, à la disposition spatiale du dimère AR, ainsi qu'au recrutement des protéines co-activatrices.

La majorité de la testostérone circulant dans le sang est liée à une protéine de transport, la SHBG (Sex-Hormone Binding Globulin) ou bien l'albumine. L'entrée de la testostérone dans les cellules prostatiques peut se faire soit par diffusion simple au travers de la membrane plasmique soit via des transporteurs de protéines. Une fois au sein du cytosol, la testostérone est métabolisée en dihydrotestostérone (DHT) par la 5 α -réductase.



En absence de ligand, le récepteur AR présent au niveau cytoplasmique est fixé à la filamine-A et couplé à une protéine de choc thermique, la protéine Hsp40 le maintenant dans un état prêt à recevoir le ligand, et à d'autres molécules chaperonnes.

Lorsque le ligand (testostérone ou DHT) se lie au récepteur AR, celui-ci subit un changement de sa conformation spatiale, se dissocie de la filamine-A et de la protéine Hsp pour se lier à ses co-régulateurs ARA70 et l'importine- α . Après translocation dans le noyau, le récepteur AR se dimérise et se fixe sur des régions spécifiques de l'ADN nommées ARE (AR-response elements). Des protéines co-activatrices se fixent au récepteur AR : les protéines SRC-1, TIF2 et GRIP1 sont capables de recruter des facteurs de transcription et des co-activateurs additionnels stabilisant ainsi la liaison du récepteur au ligand et favorisant aussi la transactivation des gènes cibles. En effet, les co-activateurs recrutés, tels que les CBP (protéines de liaison aux protéines CREB [cAMP response element binding protein]) présentent une activité histone acétyltransférase (HAT) et interagissent avec le récepteur AR pour faciliter le remodelage de la chromatine et la liaison du récepteur à la machinerie transcriptionnelle. Ainsi, la transcription des gènes cibles du récepteur AR est activée. Une fois son rôle de facteur de transcription effectué, le récepteur AR est dégradé par le protéasome (Figure I-8).

Ce récepteur AR est responsable de la morphogénèse complète de la glande prostatique, de la sécrétion de facteurs spécifiques de la prostate (comme le PSA) et est important pour la survie et la fonctionnalité des cellules sécrétrices de la prostate en régulant l'expression paracrine des facteurs de croissance tels que FGF ou EGF dans les cellules du stroma. Durant l'initiation du cancer de la prostate, ce contrôle paracrine est remplacé par une activation autocrine AR-dépendante permettant aux cellules de survivre à la fois pour l'angiogénèse et la migration.

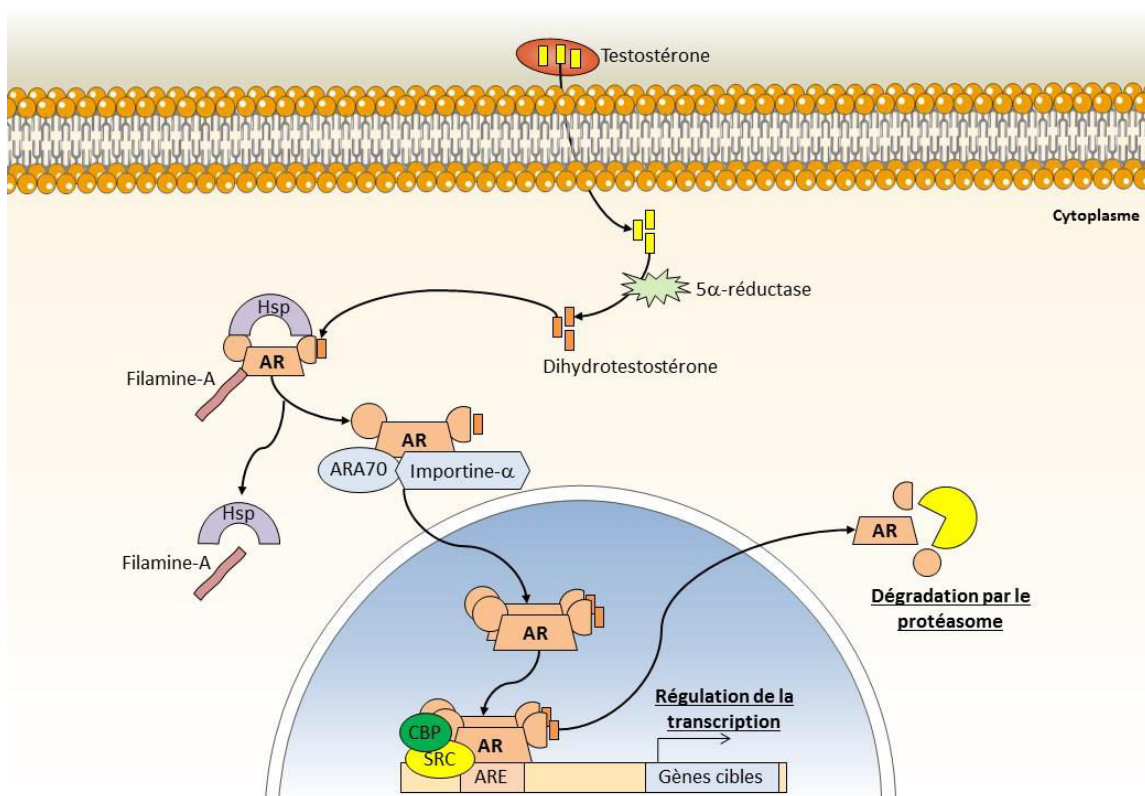


Figure I- 8 - Voie génomique classique de l'activation des récepteurs AR.

Une fois lié à la dihydrotestostérone (DHT), le récepteur AR se libère de la filamine-A et de la protéine Hsp pour se lier à ses co-régulateurs (ARA70 et l'importine α) en vue d'être transloqué dans le noyau. A l'aide de ses co-activateurs (SRC et CBP), le récepteur AR se lie aux régions ARE de l'ADN afin de réguler la transcription de ses gènes cibles. Il est ensuite dégradé par le protéasome. D'après Bennett et al., 2010 (8)



Le large éventail de mécanismes cellulaires impliquant les récepteurs AR justifie qu'une dérégulation de leur fonctionnement aboutisse à des pathologies telles que le cancer de la prostate (9). Cette observation est à l'origine du développement de la privation androgénique comme traitement contre le cancer de la prostate.

I.3.2. Les effets de la privation androgénique

Connaissant l'implication des récepteurs AR dans l'activation, notamment, de la prolifération cellulaire, de nombreuses recherches ont pensé judicieux de priver la tumeur prostatique d'androgènes afin d'inhiber sa croissance. Dans ce but, une castration chimique ou chirurgicale peut être envisagée. Ainsi, il a été démontré que la privation androgénique aboutit à de nombreux changements moléculaires au sein de lignées cancéreuses prostatiques *in vitro* mais également au sein de tumeurs prostatiques *in vivo*.

En effet, la privation androgénique induit l'inhibition de la prolifération cellulaire dans des lignées cellulaires par arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 dû à l'inhibition de l'expression de plusieurs cyclines telles que les cyclines D1 (10) E et A (11) ainsi que de la protéine CDK-2 impliquée dans la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire et dans sa progression vers la phase G2 (Figure I-9). De plus, selon les lignées cellulaires étudiées, l'effet de cette méthode diffère : la privation androgénique induit la sénescence des cellules LNCaP (12) mais n'a aucun effet sur le cycle cellulaire des lignées PC-3 et DU 145, ces dernières étant reconnues comme des lignées cancéreuses prostatiques humaines androgéno-indépendantes. Aussi, cette inhibition de la prolifération cellulaire est également démontrée *in vivo* par diminution du volume tumoral.

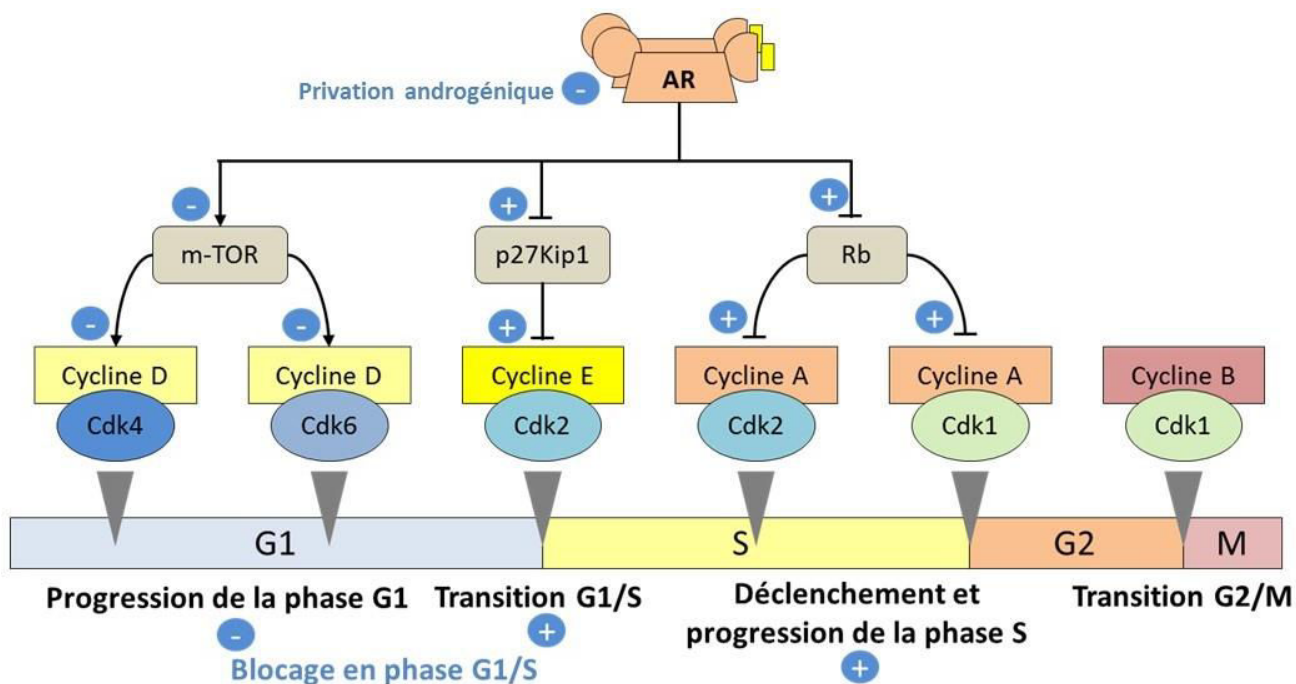


Figure I- 9 - Les récepteurs aux androgènes et cycle cellulaire.

Les récepteurs AR activés activent Cdk4 par stimulation de l'accumulation de cycline D via mTOR (mammalian Target of Rapamycin) permettant ainsi la progression de la phase G1 du cycle cellulaire. Ils dégradent p27Kip1 et permettent ainsi la levée de son inhibition sur la cycline E entraînant ainsi la transition G1/S. Ces récepteurs favorisent également la phosphorylation de la protéine Rb (retinoblastoma tumor suppressor) par phosphorylation, permettant la levée de son inhibition sur la cycline A favorisant ainsi le déclenchement et la progression de la phase S. La privation androgénique (en bleu) induit l'inhibition des cyclines D, E et A à l'origine d'un blocage en phase G1/S.



L'absence d'androgènes induit également la mort cellulaire programmée (ou apoptose) des cellules LNCaP via l'activation de la voie apoptotique mitochondriale (activation de la pro-caspase 9, de la pro-caspase 3, clivage de la protéine PARP, fragmentation de l'ADN) (13). Elle induit également l'activation de la voie PI3K/Akt connue comme une voie de survie cellulaire (14). L'inhibition de la voie PI3K/Akt augmente l'effet apoptotique de la privation androgénique. Ainsi, la stimulation aberrante de la voie PI3K/Akt en cas de privation androgénique semble être impliquée dans la survie des cellules LNCaP et être considérée comme une transformation vers l'androgéno-indépendance. En revanche, la privation androgénique n'a aucun effet apoptotique sur les lignées PC-3 et DU 145.

Enfin, les androgènes jouent un rôle important dans l'angiogenèse et la néovascularisation tumorale via la libération de facteurs angiogéniques (tels que le VEGF) (15) et la répression de leurs antagonistes (la thrombospondine-1 et l'ADAMTS1). Ainsi, la privation androgénique permet l'inhibition de la vascularisation des tumeurs.

La privation androgénique a donc montré des effets encourageants quant au traitement du cancer de la prostate, à condition que celui-ci ne soit pas hormono-indépendant, mais présente cependant des effets secondaires importants : impuissance, baisse de la libido, fatigue, bouffées de chaleur, ostéoporose, troubles cognitifs ou encore anémie (16).

I.3.3. Les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de l'androgéno-indépendance

Suite à une castration chimique ou chirurgicale, aucune activité des récepteurs AR ne devrait être décelée. Néanmoins, des recherches cliniques ont démontré que, dans certains cas, des cellules prostatiques tumorales continuent d'exprimer à la fois les récepteurs AR mais surtout des gènes connus pour être sous contrôle androgénique (tels que le PSA) : on parle d'hormono-résistance.

I.3.3.1. Les mécanismes cellulaires

En cas de cancer de la prostate, l'épithélium prostatique est à la fois formé de cellules tumorales androgéno-dépendantes et androgéno-indépendantes. La privation androgénique induit uniquement la mort des cellules androgéno-dépendantes, laissant ainsi intactes les cellules androgéno-indépendantes. Ces dernières survivent et prolifèrent avec une fréquence d'expansion clonale nettement supérieure aux cellules androgéno-dépendantes ($1/10^5$ - 10^6) : on parle d'échappement hormonal (17).

De plus, les cellules basales bordant l'épithélium prostatique peuvent également présenter un caractère androgéno-indépendant. Celles-ci étant connues comme cellules régénératrices de l'épithélium prostatique semblent être responsables de la formation de cellules cancéreuses prostatiques résistantes à la privation androgénique.

I.3.3.2. Les mécanismes moléculaires

La majorité (80%) des cancers de la prostate présentant une hormono-résistance continuent d'exprimer les récepteurs AR, suggérant que la progression vers cette hormono-résistance est due à une activation persistante de ces récepteurs. Cette dernière peut être due à différents changements au niveau du gène codant les récepteurs AR (8). Ce gène peut être sujet à un polymorphisme : le domaine NTD contient des répétitions tri-nucléotidiques polymorphiques (CAG) pouvant jouer un rôle dans la dérégulation des récepteurs AR. En effet, des variations de longueur de ces répétitions (entre 11 et 31) peuvent affecter la stabilité de la liaison du domaine N-terminal au domaine de liaison de l'ADN, liaison nécessaire à la formation du dimère de AR mais aussi au recrutement des protéines



co-activatrices. Les AR contenant ces répétitions CAG ne pourront pas rompre leur liaison aux androgènes les empêchant ainsi de rejoindre le cytoplasme pour être dégradés par le protéasome. Une accumulation nucléaire des récepteurs AR est donc induite. De plus, des mutations au niveau du domaine LBD peuvent causer un élargissement du site de liaison au ligand permettant ainsi la fixation d'autres androgènes tels que la progestérone ou les œstrogènes. Ce phénomène conduit à l'activation et l'accumulation nucléaire des récepteurs AR en absence de testostérone. Enfin, une amplification anarchique du gène codant les récepteurs AR peut être induite via la voie PI3K/Akt ou via la voie NFκB. Cela induit une augmentation de l'expression des récepteurs AR et leur accumulation au sein du noyau (**Figure I-10**).

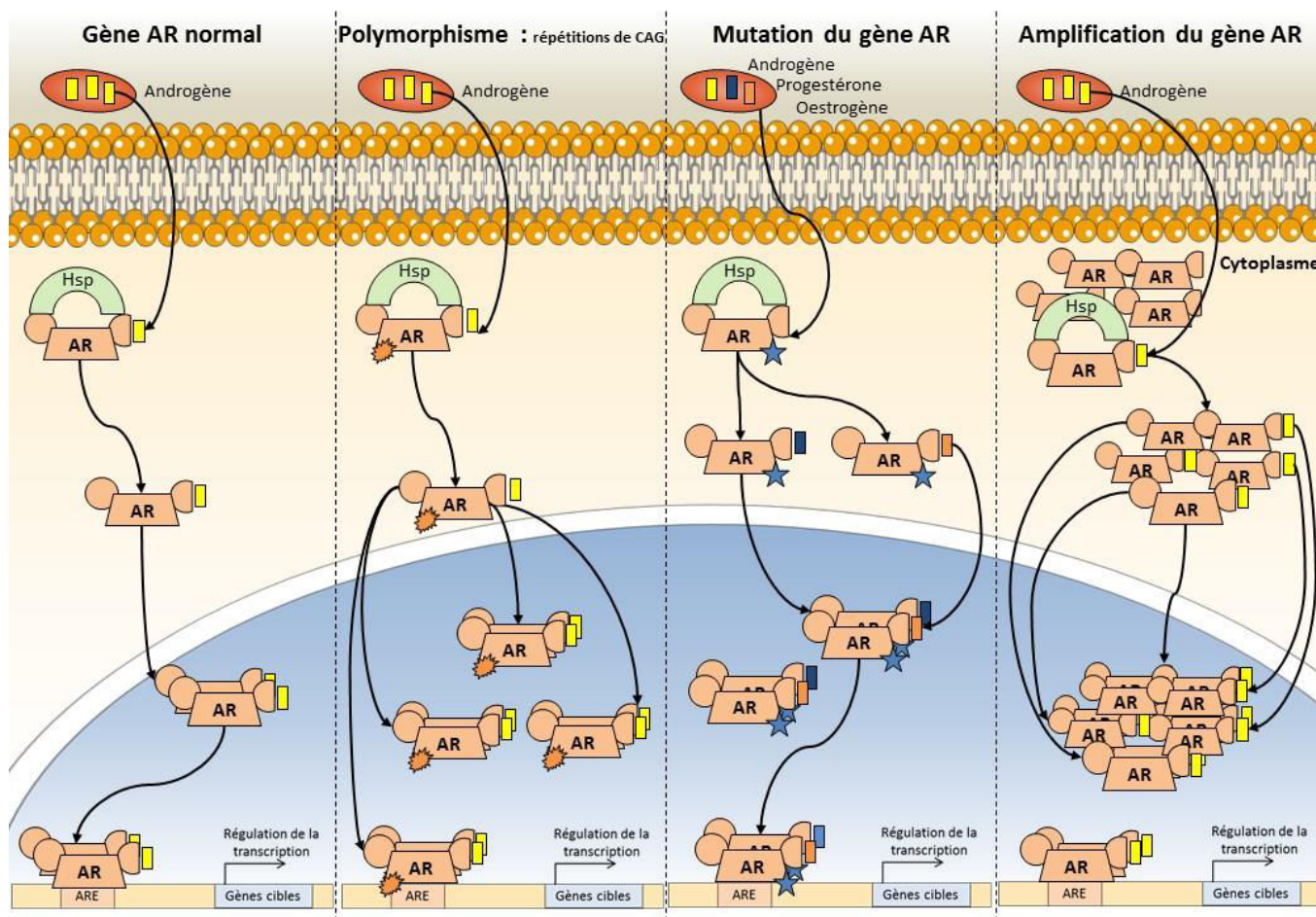


Figure I- 10 - Changements de l'activité des récepteurs AR dus à des modifications génomiques.

Gène AR normal : un seul dimère AR est présent au sein du noyau. Polymorphisme : le nombre de répétitions CAG influence la liaison AR/androgène et AR s'accumule au sein du noyau au lieu d'être dégradé dans le cytoplasme par le protéasome. Mutations du gène AR : AR est activable par d'autres stéroïdes que la testostérone (progestérone et œstrogènes) et s'accumule dans le noyau. Amplification du gène AR : une augmentation du taux de protéines AR dans les cellules cancéreuses permet le maintien de l'activité des récepteurs AR malgré une faible concentration d'androgènes résiduels. D'après Bennett et al., 2010 (8).

Une hormono-résistance peut également être due à des phénomènes indépendants du gène codant les récepteurs AR.

L'augmentation de l'expression des protéines co-activatrices ou encore de cytokines et de facteurs de croissance tels que EGF, IGF, IL-6, Wnt et Stat5a/b peuvent favoriser l'expression des récepteurs AR en présence de faibles concentrations en androgènes (18).



De plus, l'activation constitutive d'Akt dans les cellules cancéreuses prostatiques induit une activation constitutive du facteur de transcription NFκB dans ces cellules. Cette activation est responsable de la prolifération de ces cellules, ainsi que de leur résistance à l'apoptose et contribue à la progression vers l'hormono-indépendance. En effet, NFκB a la capacité de se fixer sur les séquences ARE induisant ainsi la transcription des gènes contrôlés par les récepteurs AR (19).

Un large panel de traitements existe pour lutter contre le cancer de la prostate. Néanmoins, les traitements utilisés en clinique voient des cas de résistance se développer tels que cette hormono-résistance. La recherche tend donc à développer de nouvelles stratégies thérapeutiques en vue d'un meilleur dépistage pour une prise en charge plus précoce et surtout en vue d'une baisse du taux de récurrence.

I.4. Les traitements

En cas de cancer de la prostate, le choix du traitement est conditionné par l'ensemble des différents facteurs cités précédemment, tels que le bilan d'extension tumorale (via la classification TNM), le score de Gleason et le dosage de PSA, auxquels s'ajoutent l'âge du patient, la faisabilité et les effets secondaires du traitement.

Ainsi, un large panel de traitements est envisageable selon le stade de la tumeur (**Tableau 5**) : la surveillance, la prostatectomie totale, la radiothérapie ou encore l'hormonothérapie. Ces dernières décennies ont vu se développer de nouvelles thérapies telles que la thérapie focale (cryothérapie, ultrasons focalisés de haute intensité, radiofréquence, radiothérapie externe, curiethérapie, cyberknife, électroporation irréversible) ou encore la thérapie laser pour le traitement focal (thermothérapie Laser Interstitielle, Photothérapie dynamique).

Stade	Recommandations thérapeutiques prévues
1 et 2	Surveillance, prostatectomie radicale, radiothérapie, hormonothérapie, curiethérapie
3 et 4A	Prostatectomie radicale, radiothérapie + hormonothérapie, hormonothérapie seule
4B	Hormonothérapie
4B	En cas d'échappement hormonal : chimiothérapie

Tableau 5 - Recommandations thérapeutiques prévues suivant le stade multicritère de la tumeur prostatique.

I.4.1. La surveillance

À l'issue du bilan initial, dans certains cas, une attitude de « surveillance active » initiale est une option possible. Elle consiste à évaluer régulièrement l'évolution de la maladie (toucher rectal et dosage du PSA total tous les 6 mois, biopsie à 1 an puis tous les 2 à 3 ans) pour ne débiter le traitement curatif qu'à l'apparition de tout événement indicatif d'une progression tumorale : stade clinique au-delà de T2a, temps de doublement du PSA inférieur à 3 ans, PSA supérieur à 10 ng/ml, plus de 2 biopsies positives, score de Gleason à 7 ou plus, longueur du tissu tumoral supérieure à 3 mm sur au moins une biopsie.



I.4.2. La prostatectomie radicale

La prostatectomie radicale consiste en l'ablation chirurgicale totale de la prostate et des vésicules séminales (**Figure I-11**). Elle est souvent associée à l'ablation des ganglions satellites (voie lymphatique de drainage). Cette opération peut être faite par voie chirurgicale classique avec ouverture de la paroi ou par laparoscopie (ou coelioscopie). Après l'opération, un dosage du taux de PSA est effectué et celui-ci devrait s'abaisser à un niveau indétectable une fois que la prostate a été retirée.

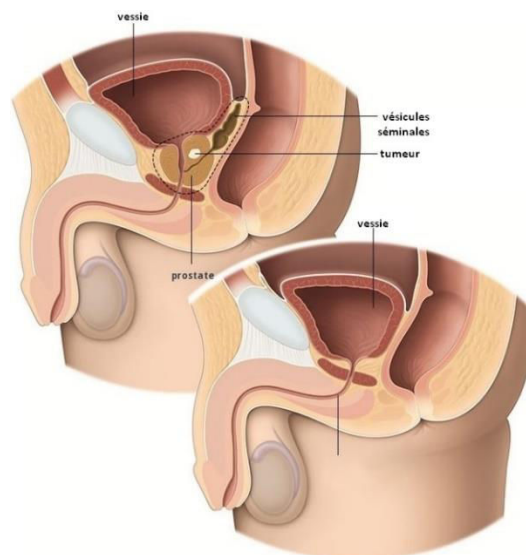


Figure I- 11- La prostatectomie radicale

La prostatectomie radicale consiste en l'ablation chirurgicale totale de la prostate et des vésicules séminales. D'après l'European Association of Urology (EAU).

Cependant, ce type de traitement entraîne fréquemment des effets secondaires tels que des troubles sexuels et des troubles de la continence. En effet, l'impuissance est très fréquente après l'intervention (70% des cas) mais s'améliore généralement dans les mois qui suivent (jusqu'à 18 mois après l'intervention). Ce risque d'impuissance dépend de l'âge, de la puissance sexuelle avant l'intervention, de la possibilité, au moment de l'intervention de préserver les nerfs érecteurs. Ce choix engendre cependant le risque de laisser une partie de la tumeur en place. Enfin, après retrait de la sonde urinaire, on assiste souvent à des troubles de la continence. L'amélioration est habituelle dans les semaines qui suivent : plus de 90% des patients n'ont pas besoin de protection 1 an après la prostatectomie radicale. La prostate et les ganglions enlevés par le chirurgien sont analysés au microscope par un médecin anatomopathologiste qui établit un compte rendu précisant les caractéristiques du cancer et son extension. Cette analyse peut conduire à envisager un traitement complémentaire à la prostatectomie (radiothérapie, hormonothérapie).

I.4.3. La radiothérapie

La radiothérapie est utilisée depuis de nombreuses années pour traiter de nombreux cancers dont le cancer de la prostate. Elle sert parfois de complément à la prostatectomie (20). La radiothérapie externe est la plus connue et la plus utilisée, la source de rayonnement étant à l'extérieur du patient donc non invasive. Des accélérateurs linéaires d'électrons produisant des faisceaux de rayons X haute énergie et des faisceaux d'électrons sont utilisés en vue de détruire l'ADN des cellules tumorales.



Il existe également la radiothérapie métabolique vectorielle pour laquelle la source radioactive est sous forme liquide ou de gélule, et est injectable afin de se fixer sur les cellules cibles et les détruire (**Figure I-12**). Les effets secondaires, identiques à ceux de la prostatectomie radicale, restent cependant très fréquents.

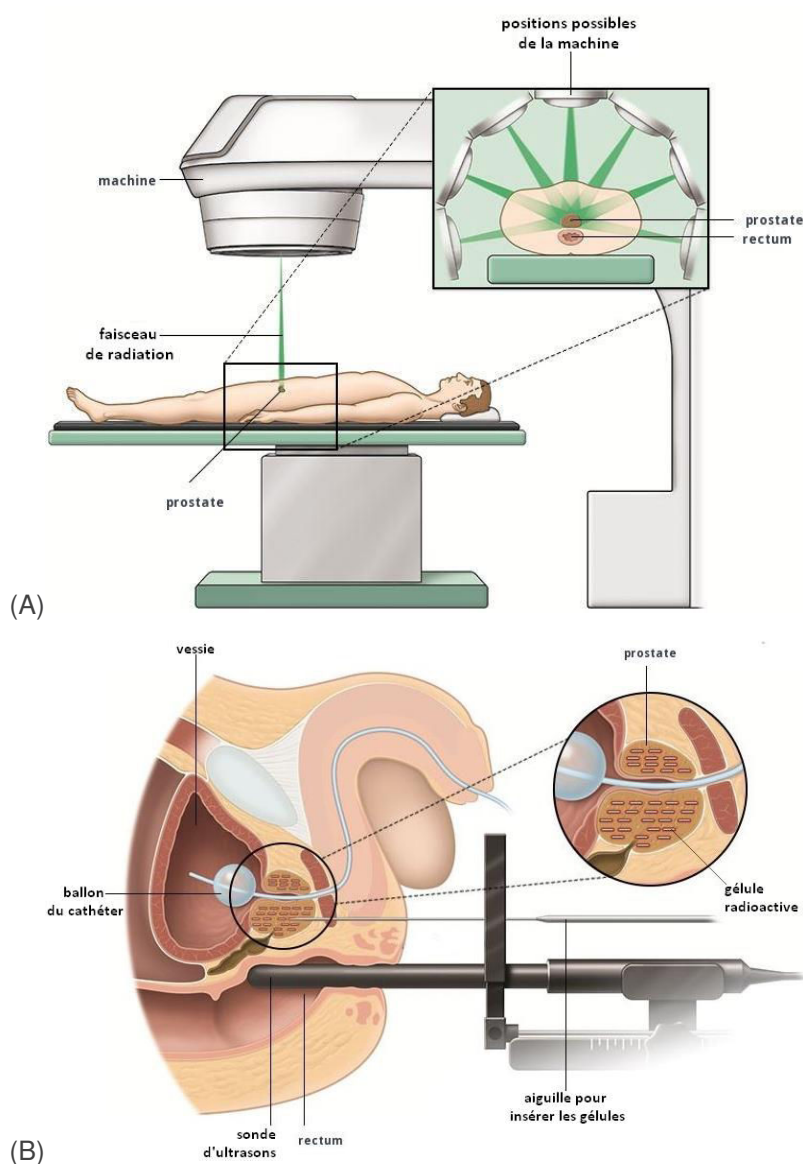


Figure I- 12- La radiothérapie et cancer de la prostate.

La radiothérapie existe sous 2 formes : (A) la radiothérapie externe (la source de rayonnement est à l'extérieur du patient) et (B) la radiothérapie métabolique vectorielle (des gélules radioactives sont injectées au niveau des cellules cancéreuses pour un meilleur ciblage). D'après l'European Association of Urology (EAU).

I.4.4. L'hormonothérapie

L'hormonothérapie consiste à inhiber la production de testostérone en vue d'annuler son effet stimulant sur la prolifération des cellules cancéreuses (**Figure I-13**). Dans ce but, plusieurs voies sont envisageables. Une intervention chirurgicale (ablation des testicules, lieu de production de la testostérone) entraîne une réduction de 90 à 95 % du taux de testostérone dans le corps. Les cellules cancéreuses de la prostate deviennent rapidement plus petites en réponse à la privation soudaine de testostérone.



Un traitement médicamenteux est également possible via l'utilisation :

- des analogues de la LHRH (hormone de libération de la lutéinostimuline) : la LHRH, produite par l'hypothalamus, est l'hormone responsable de la production de testostérone. Son inhibition via l'administration d'analogues entraîne d'abord une augmentation de la production de testostérone pendant une très courte durée, puis une diminution qui empêche la croissance des cellules cancéreuses. Injectés sous la peau, les analogues de la LHRH les plus couramment utilisés sont la leuproréline, la goséréline, la buséréline et la triptoréline.
- des anti-androgènes : ils se fixent aux récepteurs hormonaux présents au niveau des cellules sécrétrices de la prostate, rentrant ainsi en compétition avec la testostérone et bloquant son effet sur la croissance des cellules tumorales. Pris par voie orale sous forme de comprimés ou par injection intramusculaire sous forme liquide, les anti-androgènes les plus couramment utilisés sont le flutamide, le bicalutamide, le nilutamide, l'acétate de cyprotérone.

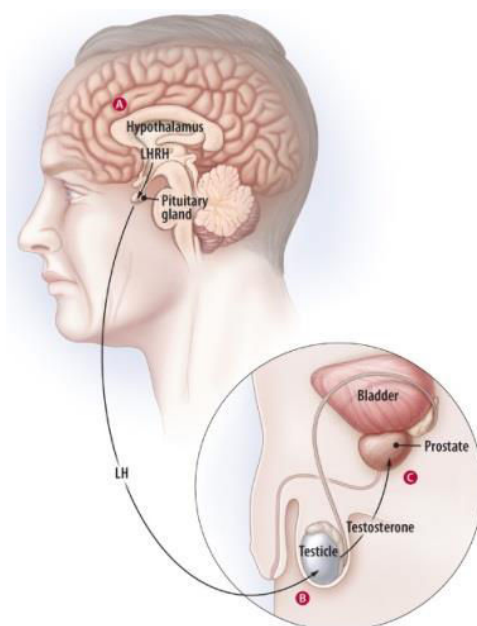


Figure I- 13- L'hormonothérapie et cancer de la prostate.

La testostérone favorisant la prolifération des cellules cancéreuses, le but de l'hormonothérapie est d'inhiber la production de cette hormone. Cela peut se faire à 3 niveaux : l'inhibition de la LHRH via l'administration d'analogues de la LHRH (A), l'ablation des testicules (B) ou encore l'utilisation d'anti-androgènes (C).

I.4.5. La chimiothérapie

Certains cancers de la prostate sont dits hormono-résistants (ou résistants à la castration) lorsqu'un cancer réapparaît ou évolue sous hormonothérapie. Dans ce cas, on peut modifier le traitement hormonal ou envisager un traitement par chimiothérapie lors de l'apparition de douleurs osseuses métastatiques ou d'altération de l'état général ou en cas de critères de progression rapide. Néanmoins, la chimiothérapie ne s'est que très récemment révélée efficace dans la lutte contre le cancer de la prostate. C'est pourquoi ces traitements restent administrés uniquement dans le cadre d'essais cliniques. Les traitements les plus utilisés sont le docétaxel et le mitoxantrone (21) souvent associés à un anti-inflammatoire (22). Cette association a montré des effets bénéfiques dans la réduction de la douleur, l'amélioration de la qualité de vie et la survie (23). Cependant, de nombreux effets secondaires peuvent se manifester : nausées, vomissements, faible nombre de globules blancs (neutropénie ou leucopénie), ce qui accroît le risque d'infection, diarrhée, œdèmes des pieds ou de la partie inférieure des jambes, diminution du désir sexuel, insomnie, perte de cheveux (alopécie), ou encore engourdissement ou picotements dans les mains et les pieds.



I.4.6. La thérapie focale

Le développement de nouvelles alternatives thérapeutiques permettant un traitement focal des lésions cancéreuses au sein de la prostate est aujourd'hui discuté. La thérapie focale ou ablation partielle ou sub-totale est une technique permettant de réaliser l'ablation d'une région cancéreuse connue de la prostate en épargnant le parenchyme glandulaire sain dans le but de diminuer les effets indésirables liés à la proximité des bandelettes neurovasculaires et du sphincter strié (**Figure I-14**).

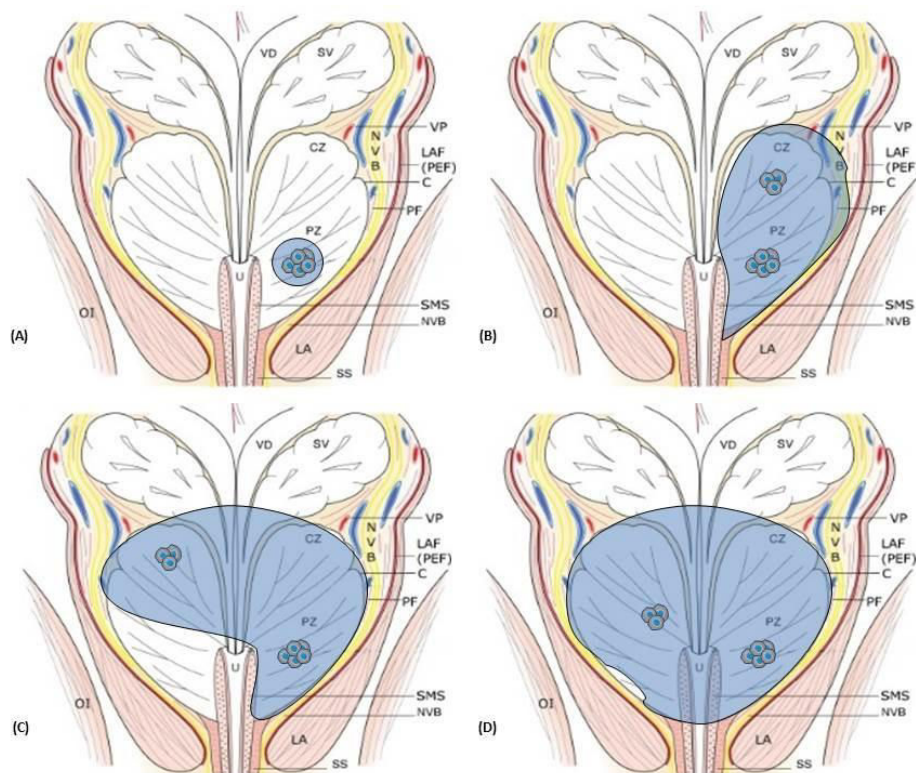


Figure I- 14- Représentation des options de traitement en thérapie focale prostatique.

(A) Véritable ablation focale. (B) Hémiablation. La zone traitée est étendue à la bandelette vasculonerveuse (NVB) ipsilatérale et au tissu périprostatique (traitement d'une possible extension tumorale extracapsulaire). (C) Ablation des $\frac{3}{4}$ de la prostate. Les 25% non traités de glande seront suivis en surveillance active. (D) Ablation quasi totale. Une petite quantité de parenchyme n'est pas traitée afin de préserver la bandelette vasculonerveuse de ce côté. (U : urètre ; SV : vésicule séminale ; VD : ampoule différentielle).

Différentes sources d'énergie sont utilisées en clinique pour l'ablation partielle de la prostate : la cryothérapie, les ultrasons focalisés de haute intensité (HIFU) ou encore la thérapie laser.

I.4.6.1. La cryothérapie

Effectuée sous anesthésie générale ou loco-régionale, la cryothérapie consiste en la destruction des cellules tumorales prostatiques par congélation brutale et répétée à l'aide de multiples sondes refroidissantes introduites au travers du périnée (**Figure I-15**). L'insertion d'aiguilles de monitoring permet le contrôle thermique : la température au niveau de la prostate est de l'ordre de -40°C . L'hélium et l'argon permettent respectivement d'effectuer des cycles alternatifs de réchauffement et de congélation afin d'induire la mort des cellules tumorales via la dénaturation des protéines cellulaires, la rupture des membranes cellulaires et l'ischémie induite par la stase vasculaire et la thrombose des petits vaisseaux.



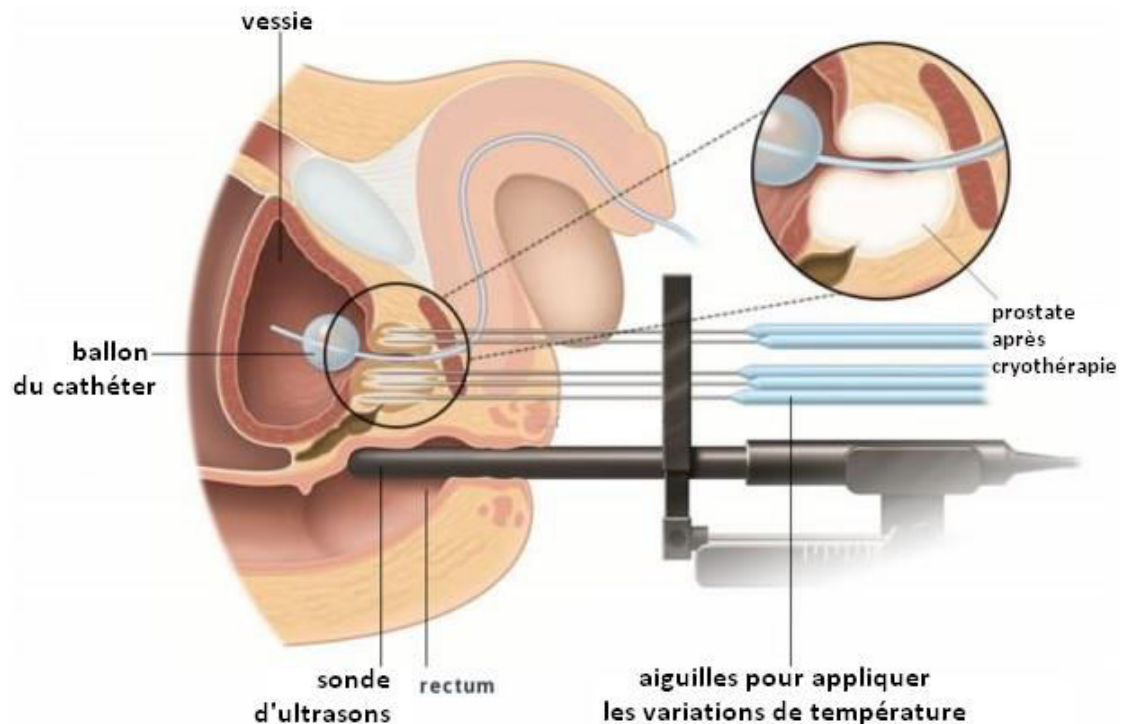


Figure I- 15- La cryothérapie et cancer de la prostate.

L'insertion d'aiguilles de monitoring permet le contrôle thermique : la température au niveau de la prostate est de l'ordre de -40°C . L'hélium et l'argon permettent d'effectuer respectivement des cycles alternatifs de réchauffement et de congélation afin d'induire la mort des cellules tumorales. D'après l'European Association of Urology (EAU).

La cryothérapie peut être réalisée en première intention mais, le plus souvent, elle est indiquée en cas de récurrence locale après radiothérapie. Son efficacité, jugée sur la décroissance du PSA, a été démontrée avec un suivi sur 10 ans (24). Il s'agit néanmoins d'une longue procédure, du fait de la répétition des cycles, et les effets secondaires restent cependant importants : impuissance (70%), obstruction vésicale et incontinence.

I.4.6.2. Les ultrasons de haute intensité (HIFU)

L'HIFU consiste en l'utilisation d'un transducteur sphérique générateur d'ondes ultrasonores focalisées en un point fixe induisant ainsi la destruction des cellules tumorales prostatiques par rupture membranaire et nécrose de coagulation (**Figure I-16**). Deux mécanismes de dommage cellulaire sont à noter :

- l'effet thermique lié à la conversion de l'énergie ultrasonore en chaleur ($>60^{\circ}\text{C}$) à l'origine de dommages irréversibles au sein des cellules cibles ;
- l'effet de cavitation résultant de l'interaction des ultrasons et des microbulles d'eau présentes dans le tissu cible, pouvant conduire à l'oscillation des microbulles, des chocs violents et la dispersion d'énergie intra-tissulaire.

La possibilité de contrôler la position du transducteur et de refroidir activement les tissus avoisinants permet de minimiser le risque de lésion hyperthermique. De plus, un monitoring en temps réel est rendu possible à l'aide de l'utilisation d'une sonde échographique ou encore une thermométrie est maintenant possible grâce au développement de sonde compatible IRM.



Dans le cadre du traitement du cancer de la prostate, la faisabilité et l'efficacité de l'HIFU focale a été rapportée pour la première fois par Madersbacher et al. en 1995 (25). Depuis, l'HIFU représente une technique thérapeutique peu invasive alternative pour les patients qui ne sont pas candidats à une prostatectomie radicale, en particulier dans les cas à risque faible ou modéré.

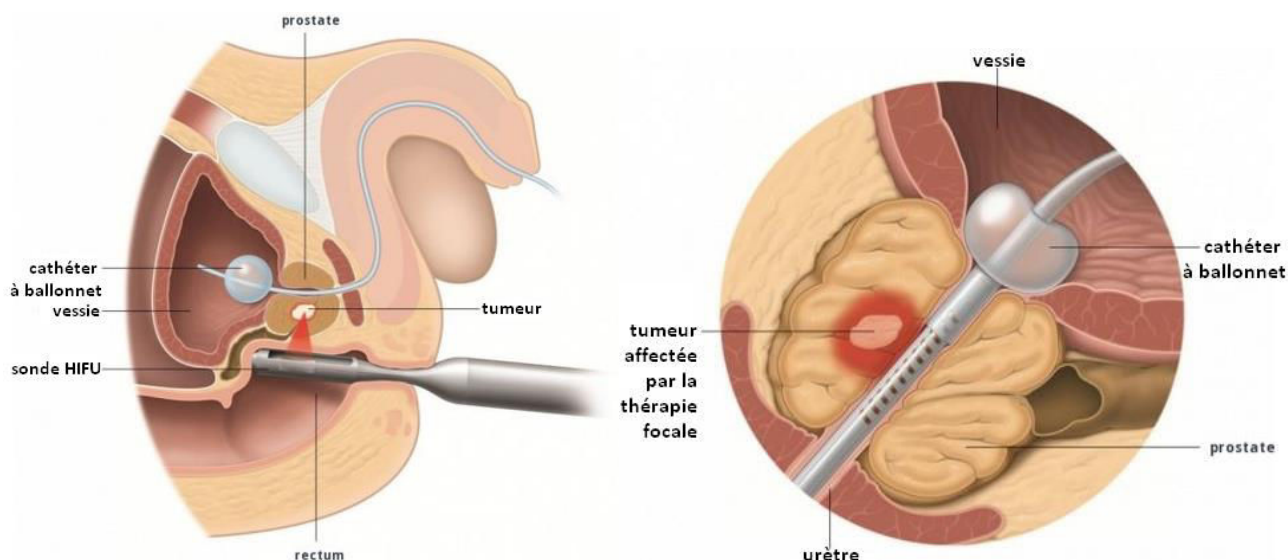


Figure I- 16- HIFU et cancer de la prostate.

Le traitement s'effectue par voie endorectale sous anesthésie générale ou loco-régionale. Une sonde est placée dans le rectum : elle émet un faisceau d'ultrasons convergents de haute intensité. La brièveté du phénomène évite la diffusion de la chaleur autour du point focal. En répétant les tirs, et en déplaçant le point focal entre chaque tir, il est possible de détruire un volume qui inclut la totalité de la glande prostatique. D'après l'European Association of Urology (EAU).

Il faut néanmoins noter que l'HIFU est une technique limitée à la fois par son relatif encombrement mais aussi par la difficulté à traiter des lésions en avant de l'urètre.

I.4.6.3. Radiofréquence interstitielle (RITA)

La RITA (Radiofrequency Interstitial Tumor Ablation) utilise des générateurs d'ondes radiofréquences, ondes qui sont délivrées dans les tissus à l'aide d'aiguilles munies d'électrodes en crochet à leur extrémité. Ces électrodes, au nombre de trois, se déploient avec un angle de séparation de 120° décrivant ainsi un volume sphérique d'environ 2 centimètres de diamètre. Ceci permet la nécrose thermique irréversible des tissus par conversion d'énergie (100°C). La faisabilité, la reproductivité et l'absence de complication liée au traitement par RITA sous guidage échographique ont été rapportées pour des patients porteurs d'adénocarcinome prostatique localisé (26) (27).

Néanmoins, la majorité des traitements localisés de tumeurs solides tels que la cryothérapie et l'HIFU, s'est montrée efficace mais présente l'inconvénient de reposer sur l'utilisation d'énergie thermique pour induire la mort cellulaire, énergie thermique à l'origine de la destruction des tissus sains avoisinants. Ce risque de destruction des cellules saines avoisinantes est à l'origine d'effets indésirables tels que des désordres sexuels ou troubles de la continence.

I.4.6.4. L'électroporation irréversible (EI)

Face aux effets indésirables de l'énergie thermique utilisée dans les traitements précédemment présentés, l'électroporation irréversible (EI) se présente comme une nouvelle technique peu invasive



qui présente l'avantage d'utiliser des énergies non thermiques. En effet, elle repose sur l'utilisation d'impulsions électriques, de haut voltage et basse énergie, circulant entre des électrodes interstitielles placées autour du tissu ciblé. Le champ électrique ainsi créé entre les électrodes induit une perméabilité membranaire irréversible et un déséquilibre de l'homéostasie intracellulaire conduisant à la mort cellulaire dans la zone ciblée. Concernant le traitement du cancer de la prostate, c'est en 2007 qu'Olik et ses collaborateurs (28) ont montré la faisabilité et l'efficacité de l'EI en préclinique. En effet, l'utilisation de l'EI sur les prostatites saines de 6 chiens induit la destruction complète de la zone ciblée sans affecter les zones voisines telles que l'urètre, les vaisseaux, les nerfs et le rectum. Néanmoins, le risque de mouvements réflexes induits par les impulsions électriques pouvant provoquer le déplacement des électrodes et donc des dommages aux structures à préserver, représente un inconvénient non négligeable de cette nouvelle technique.

Ainsi, de nombreuses sources d'énergie sont aujourd'hui disponibles en thérapie focale, certaines ayant déjà montré des résultats oncologiques encourageants alors que d'autres n'en sont qu'au stade de développement en clinique. Leur émergence dans l'arsenal thérapeutique des équipes urologiques dépendra à la fois de leur efficacité carcinologique et fonctionnelle mais aussi, d'un côté purement pratique, de leur coût et de leur encombrement.

I.4.6.5. La thérapie laser pour le traitement focal

Ces dernières décennies ont vu apparaître une nouvelle source d'énergie pouvant être utilisée dans le traitement de cancer : la lumière. On parle de thérapie laser. Cette dernière s'articule autour de deux axes : la thermothérapie laser interstitielle (LITT) et la photothérapie dynamique (PDT). Quel que soit le type de thérapie laser étudié, les dommages tissulaires induits sont fonction de la longueur d'onde utilisée (**Figure I-17**). En effet, ce choix de longueur d'onde à utiliser dépend à la fois de la capacité de la lumière à pénétrer dans les tissus mais également de la nature des molécules ciblées, capables d'absorber la lumière uniquement à certaines longueurs d'ondes.

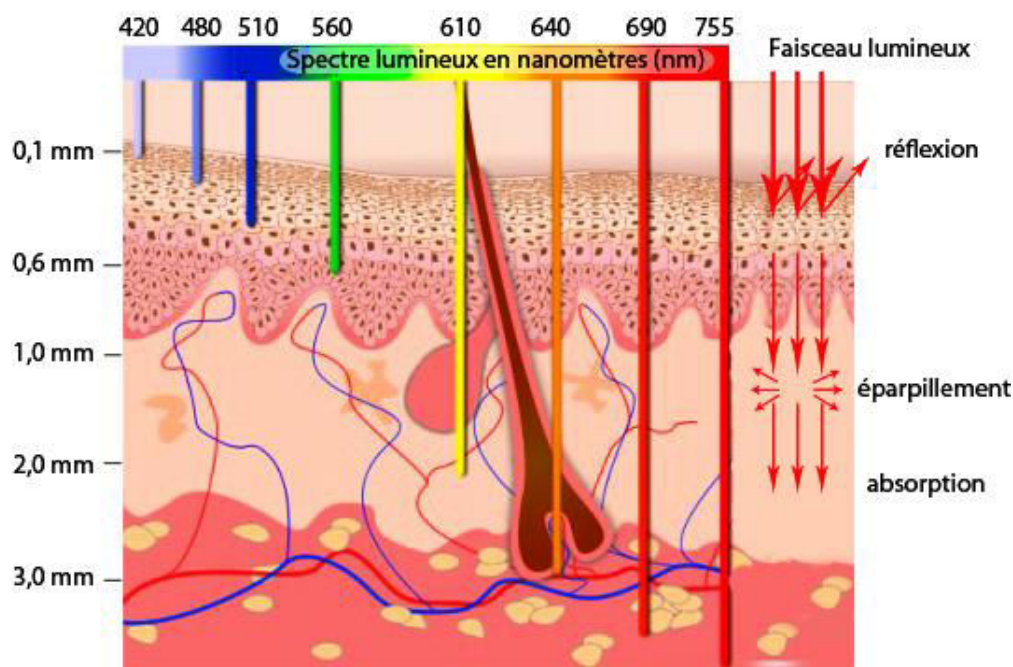


Figure I- 17- Propagation de la lumière au sein des tissus.

Plus la longueur d'onde de la lumière est importante (proche du rouge), plus la lumière pénètre au sein des tissus. Le choix de longueur d'onde utilisée est donc fonction de la profondeur des cellules cibles.



La thermothérapie Laser Interstitielle (LITT) est basée sur la destruction photothermique des tissus. L'absorption de l'énergie radiante par les chromophores tissulaires induit un dégagement de chaleur. Ce transfert d'énergie augmente en quelques secondes et est capable d'induire des dommages cellulaires irréversibles. L'extension des dommages thermiques dépend à la fois de la température induite et de la durée de tir du laser.

Dans le cadre du cancer de la prostate, après planification de la zone à traiter par IRM (Imagerie à Résonance Magnétique), des fibres optiques correspondant à un laser diode peuvent être placées par voie transpérinéale sous contrôle échographique. Les volumes des lésions correspondant bien aux volumes observés sur l'IRM de contrôle, différents essais cliniques ont démontré la faisabilité du traitement du cancer prostatique via la LITT (29) (30). Néanmoins, ces résultats carcinologiques doivent être pondérés du fait des problèmes rencontrés (présence de cellules saines dans la zone traitée, mauvaise visualisation des contours tumoraux, difficulté à guider les fibres lasers).

La Photothérapie dynamique (PDT) consiste en l'activation, par la lumière d'un photosensibilisateur (PS) délivré par voie intraveineuse ou par voie topique. L'activation de ce PS le rend toxique et induit une cascade d'évènements à l'origine de la destruction des cellules cibles (**Figure I-18**). Le développement de la PDT à visée anticancéreuse repose sur deux principes : l'affinité tumorale et la photoactivation du PS.

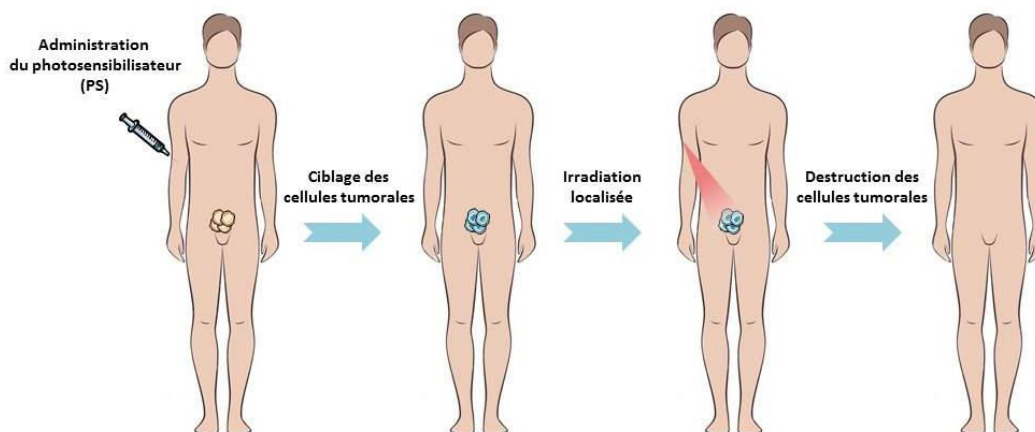


Figure I- 18- Principe de la photothérapie dynamique (PDT).

Après administration au patient, le photosensibilisateur (PS) a idéalement plus d'affinité pour les cellules tumorales que pour les cellules saines. Une fois localisé, au sein de la tumeur, il peut être photoactivé et induire une cascade d'évènements à l'origine de la mort des cellules tumorales.

Ainsi, le large choix de traitements contre le cancer de la prostate permet une bonne prise en charge des patients. Ce type de cancer étant un cancer très localisé, la thérapie focale voit naître de nombreuses perspectives. C'est notamment le cas de la photothérapie dynamique, actuellement au stade d'essai clinique pour ce type de cancer, qui se présente comme un moyen de pallier aux effets secondaires indésirables des traitements de routine, mais surtout d'éviter les nombreux cas de résistance et de récurrence, l'idéal étant la possibilité de proposer un meilleur projet de soin propre à chaque patient ou encore propre à chaque tumeur.



Chapitre II. La photothérapie dynamique (PDT)

La photothérapie dynamique (PDT) à visée anticancéreuse est une innovation thérapeutique originale reposant sur le principe séduisant qui est la destruction des cellules tumorales tout en préservant les tissus sains avoisinants. Elle consiste en l'administration d'un produit appelé photosensibilisateur (PS) capté par les cellules cancéreuses et qui, une fois activé par la lumière, est capable d'induire des réactions chimiques oxydatives à l'origine de la destruction de la tumeur.

II.1. Les mécanismes de la photothérapie dynamique

Les propriétés des PS et l'utilisation de longueurs d'onde appropriées confèrent à la PDT deux aspects distincts (**Figure I-19**) :

- la photothérapie pour laquelle le PS, préférentiellement situé au sein de la tumeur, va être activé par la lumière à une longueur d'onde spécifique afin d'induire des réactions chimiques oxydatives aboutissant à la destruction des cellules tumorales.
- le photodiagnostic pour lequel le PS, excité par une lumière de longueur d'onde appropriée, émet une fluorescence. L'analyse de cette fluorescence permet ainsi de détecter avec précision des lésions néoplasiques avec une sensibilité supérieure à celle des moyens d'investigation actuellement disponibles.

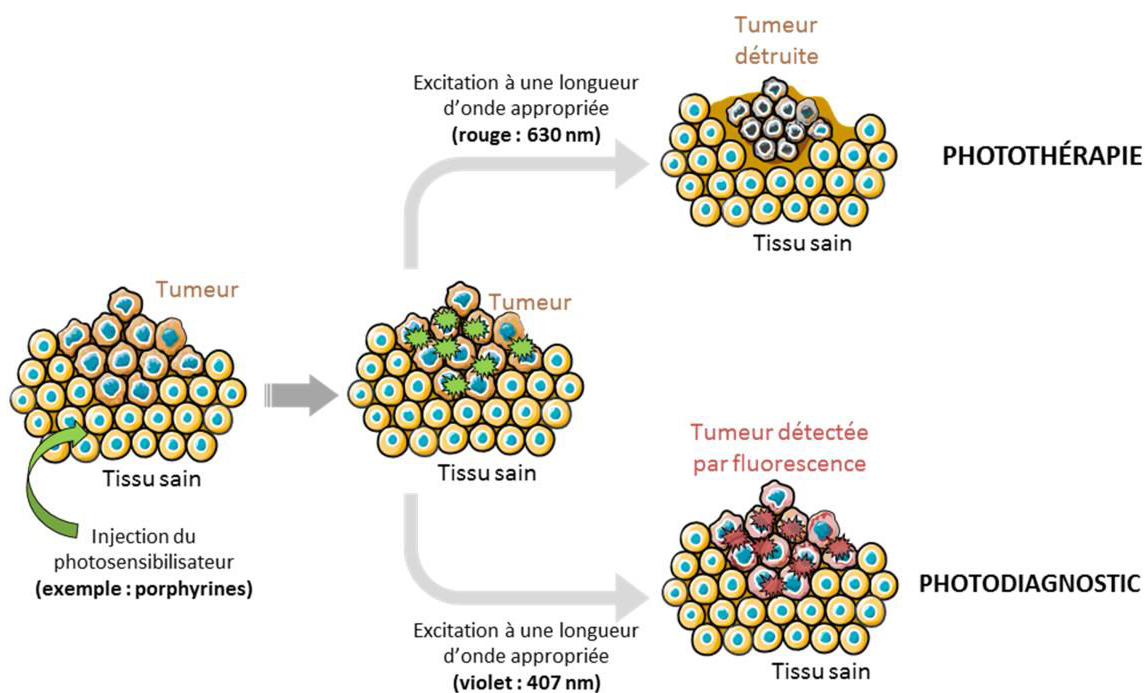


Figure I- 19- Principe des 2 composantes de la PDT : la photothérapie et le photodiagnostic. L'excitation d'un même PS à des longueurs d'onde différentes peut permettre à la fois la destruction de la tumeur par réaction oxydative mais aussi la détection de cette tumeur par fluorescence.

Le photodiagnostic dynamique (ou PDD) consiste en l'analyse de la fluorescence émise par le PS. En effet, celui-ci étant sélectif pour les tissus cancéreux, sa fluorescence émise lorsqu'il est excité par une lumière de longueur d'onde appropriée permet de détecter avec précision les lésions néoplasiques au sein d'un individu. Cette analyse est une aide précieuse en per opératoire car elle permet de guider le chirurgien lors d'une résection afin que celle-ci soit la plus complète et large possible. Cette technique a notamment fait ses preuves dans la détection de lésions utérines et



vaginales (31), en urologie dans les cancers de la vessie (32), en pneumologie dans les cancers pulmonaires (33), ou encore dans les cancers de la tête et du cou (34). La PDT est utile pour la surveillance de ces tumeurs malignes en permettant une détection précoce avant la visualisation de lésions macroscopiques et donc permet d'optimiser les traitements et d'améliorer les pronostics.

La PDT thérapeutique, quant à elle, est basée sur l'activation par une lumière visible (souvent la lumière rouge) d'un agent photosensibilisant se fixant sélectivement sur la tumeur et aboutissant à une destruction sélective du tissu néoplasique par un mécanisme d'oxydation irréversible (35).

Selon le mode d'administration du PS, deux types de PDT existent : la PDT topique utilisant un PS en application locale (crème, émulsion, solution, injection sous-cutanée) et la PDT systémique pour laquelle le PS est administré par voie intraveineuse ou par voie orale. Dans les deux cas, après administration, le PS est concentré sélectivement au sein du tissu cancéreux ; puis, une stimulation lumineuse active le PS à l'origine de réactions photochimiques induisant ainsi la mort des cellules tumorales.

Contrairement à la PDT topique, la PDT systémique présente une faible sélectivité du PS à l'origine d'une photosensibilité généralisée et prolongée des patients traités (36), du fait de l'accumulation du PS dans la peau. C'est pourquoi, les avantages de la PDT topique ont permis de nouvelles perspectives d'utilisation de la PDT dans de nombreux domaines médicaux et chirurgicaux, notamment en cancérologie et de manière très logique en dermatologie.

Néanmoins, du fait du large éventail d'avantages de la PDT face aux thérapies anticancéreuses actuelles, la recherche tend à améliorer la sélectivité des PS en vue d'étendre les champs d'application de la PDT aux tumeurs solides plus profondes.

II.2. Les réactions photochimiques

En photobiologie et en photomédecine, la terminologie « action photodynamique » est réservée aux photosensibilisations consommant de l'oxygène moléculaire. Les acteurs clés de la PDT sont donc au nombre de 3 : le photosensibilisateur (PS), la lumière et l'oxygène (**Figure I-20**).

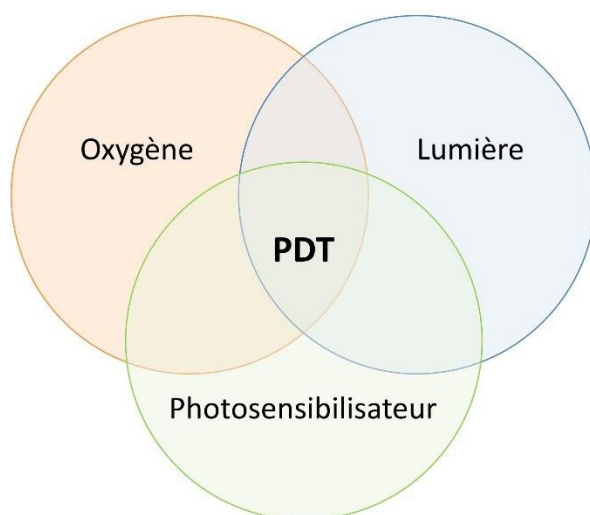


Figure I- 20- Principe général de la PDT.

Une fois activé par la lumière, le photosensibilisateur est capable d'induire des réactions chimiques oxydatives à l'origine de la destruction de la tumeur.



La photosensibilisation du PS par absorption de lumière ($h\nu$) va induire le passage du PS de son état fondamental (P_0) à un état singulet excité ($^n P^*$) de courte durée de vie. Le PS va être stabilisé par conversion interne (IC) à un niveau d'excitation singulet de plus faible énergie ($^1 P^*$) et de plus courte durée de vie. L'excès d'énergie est restitué par le PS selon 3 mécanismes :

- un dégagement de chaleur,
- une émission de photons de fluorescence (utilisée pour le photodiagnostic),
- le passage à un état intermédiaire dit « état triplet » (utilisé pour la photothérapie).

En effet, c'est uniquement lorsqu'il rejoint un état triplet de plus faible énergie ($^3 P^*$) par transition intersystème (ISC) que le PS acquiert une durée de vie plus longue pouvant ainsi induire deux réactions dites de type I et II qui vont entrer en compétition et pouvoir induire des cascades de réactions à l'origine de la destruction de la tumeur (**Figure I-21**).

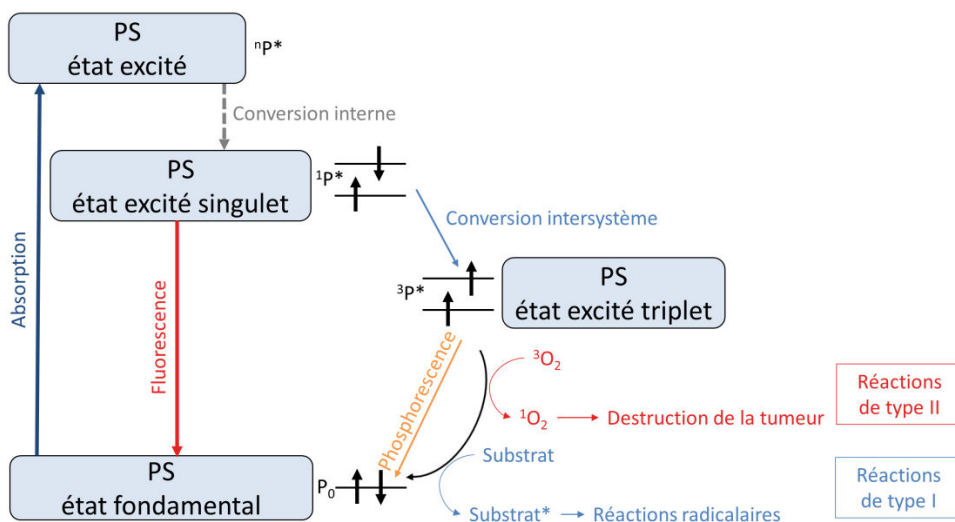
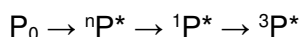


Figure I- 21- Diagramme de Jablonski.

Par absorption de lumière, le PS va passer de son état fondamental (P_0) à son état excité ($^n P^*$) puis, par conversion interne (IC), à un niveau d'excitation singulet de plus faible énergie ($^1 P^*$) pour enfin, par transition intersystème, rejoindre un état triplet ($^3 P^*$).

II.2.1. Les réactions photochimiques de type I

Selon Foote (37), les réactions photochimiques de type I consiste en l'interaction directe du PS à l'état excité avec le substrat (S) : un transfert d'électron ou d'hydrogène à l'origine de la production de radicaux libres ou d'ions radicalaires pouvant intervenir dans d'autres réactions (**Figure I-22**).

Les formes oxydées du PS (P^{\cdot}) ou du substrat (S^{\cdot}) tout comme leurs formes semi-réduites ($P^{\cdot-}$ et $S^{\cdot-}$) peuvent interagir avec l'oxygène moléculaire présent et former respectivement des radicaux peroxydes à l'origine d'une chaîne d'auto-oxydation et de l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$). Une fois formé, l'anion superoxyde peut interagir avec d'autres substrats pour former d'autres espèces réactives de l'oxygène telles que le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle $\cdot OH$.

Bien que l'oxygène ne soit pas impliqué dans la première étape du mécanisme, sa présence influence fortement les réactions chimiques qui induisent la formation de ces espèces réactives de l'oxygène qui sont de puissants oxydants pour de nombreuses biomolécules (cholestérol, certains acides aminés).



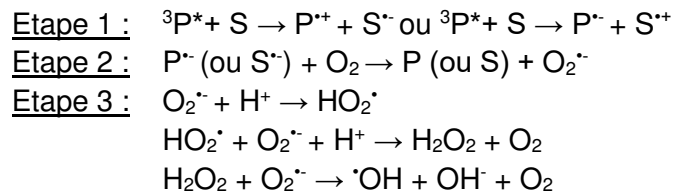
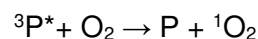


Figure I- 22- Les réactions photochimiques de type I.

Les transferts entre le PS et un substrat peuvent être à l'origine de la formation d'espèces réactives de l'oxygène telles que l'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\cdot OH$).

II.2.2. Les réactions photochimiques de type II

Dans les réactions photochimiques de type II, l'oxygène entre en réaction dès la première étape du processus. En effet, un transfert d'énergie s'effectue du PS à l'état triplet vers l'oxygène moléculaire induisant le retour du PS à son état fondamental et la formation d'oxygène singulet (1O_2).



L'oxygène singulet est capable d'oxyder de nombreuses biomolécules présentes dans la cellule. En effet, les acides aminés étant très sensibles à l'oxydation, notamment la cystéine, la tyrosine et le tryptophane, les protéines représentent des cibles primordiales de l'oxygène singulet. C'est aussi le cas des lipides insaturés comme les acides gras polyinsaturés qui constituent une part importante des substrats de 1O_2 généré dans les structures membranaires.

La réaction d'oxydation des biomolécules par 1O_2 est très rapide conférant ainsi à 1O_2 une demi-vie très courte (4 μ s dans l'eau et probablement plus courte dans la cellule) (38). Le site intracellulaire de localisation du PS apparaît donc déterminant quant au site de formation de 1O_2 : la réponse de la cellule suite à la génération et à la réaction de 1O_2 est dépendante du site de formation de 1O_2 ; on parle de « réponse cellulaire à 1O_2 résolue dans l'espace ». Cet espace subcellulaire, dans lequel se situe sélectivement le PS, peut être la totalité ou une partie d'un organite, une structure (membrane, microtubules) ou le proche environnement d'une protéine cible. Par exemple, le type de mort cellulaire induit par la PDT est fonction du site de localisation du PS : un photosensibilisateur présent au niveau de la mitochondrie, du réticulum endoplasmique, ou encore des lysosomes va préférentiellement induire un phénomène de mort cellulaire programmée ou apoptose, alors qu'un photosensibilisateur situé au niveau de la membrane plasmique induit plutôt un mécanisme non-apoptotique (39).

Cette terminologie « type I et type II » ne s'applique qu'aux réactions primaires qui découlent de l'excitation du PS. En effet, les radicaux formés par les réactions de type I peuvent également se former après une réaction de type II et induire une réponse cellulaire : 1O_2 formé par les réactions de type II, en réagissant avec les protéines ou les lipides insaturés, peut produire des hydroperoxydes qui peuvent être convertis en espèces radicalaires qui ont une durée de vie plus longue, qui peuvent diffuser à distance dans la cellule et produire des dommages oxydants majeurs (38) (**Figure I-23**).

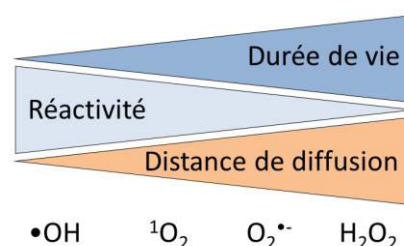


Figure I- 23– Relation entre la durée de vie, la réactivité et la distance de diffusion des ROS.



II.3. Le photo-blanchiment des PS

La majorité des PS utilisés dans le cadre de la PDT tels que les porphyrines et leurs dérivés, subissent l'action des espèces réactives de l'oxygène nouvellement formées. Au cours de leur photoactivation, ils subissent alors une dégradation progressive entraînant ainsi une diminution de leur capacité à absorber la lumière : on parle de photo-blanchiment. Ce phénomène met en jeu deux mécanismes : la photo-dégradation, soit une fragmentation de la structure du photosensibilisateur à l'origine de la formation de plusieurs photo-produits n'absorbant pas ou peu la lumière visible, et la photo-transformation, soit une perte de l'absorbance ou de la fluorescence du PS à certaines longueurs d'ondes gardant cependant la structure du photosensibilisateur intacte. Cette photo-transformation présente l'avantage d'induire la formation de photo-produits pouvant eux-mêmes servir de PS (40). Dans la plupart des cas, ce photo-blanchiment correspond à une oxydation du photosensibilisateur à l'état fondamental.

Dans le cadre de la photothérapie dynamique anticancéreuse, les doses de lumière conventionnellement appliquées induisent le photo-blanchiment du photosensibilisateur à la fois au sein de la tumeur et dans les zones proches de la source lumineuse, phénomène présentant l'inconvénient de diminuer les concentrations de photosensibilisateur dans les zones irradiées.

De plus, un des points majeurs de la PDT est de préserver les tissus sains avoisinants la tumeur. Ainsi, une faible dose de photosensibilisateur associée à une forte dose de lumière est une solution pour obtenir la destruction de la tumeur tout en limitant les dommages des tissus sains. En effet, ces conditions permettent le photo-blanchiment de la faible quantité de photosensibilisateur situé dans les tissus sains alors que le tissu tumoral contenant davantage de photosensibilisateur peut être détruit.

Le choix du photosensibilisateur apparaît donc important dans le cadre de la thérapie photodynamique anticancéreuse. C'est pourquoi, au cours de ces dernières décennies, la recherche tend à développer de nouveaux PS répondant à différents critères dits « idéaux ».

II.4. Les photosensibilisateurs

Les PS sont généralement classés en 2 catégories : les dérivés non porphyriniques et les dérivés porphyriniques. Bien que moins étudiés que les PS porphyriniques, certains PS non dérivés de porphyrines, et notamment, l'hypéricine, ont aussi montré leur efficacité en tant que traitements anticancéreux. Néanmoins, les dérivés de porphyrines sont les PS les plus étudiés. Ils sont classés en 3 catégories : les PS de première génération, les PS de deuxième génération qui par modification chimique deviennent les PS de troisième génération (**Figure I-24**).



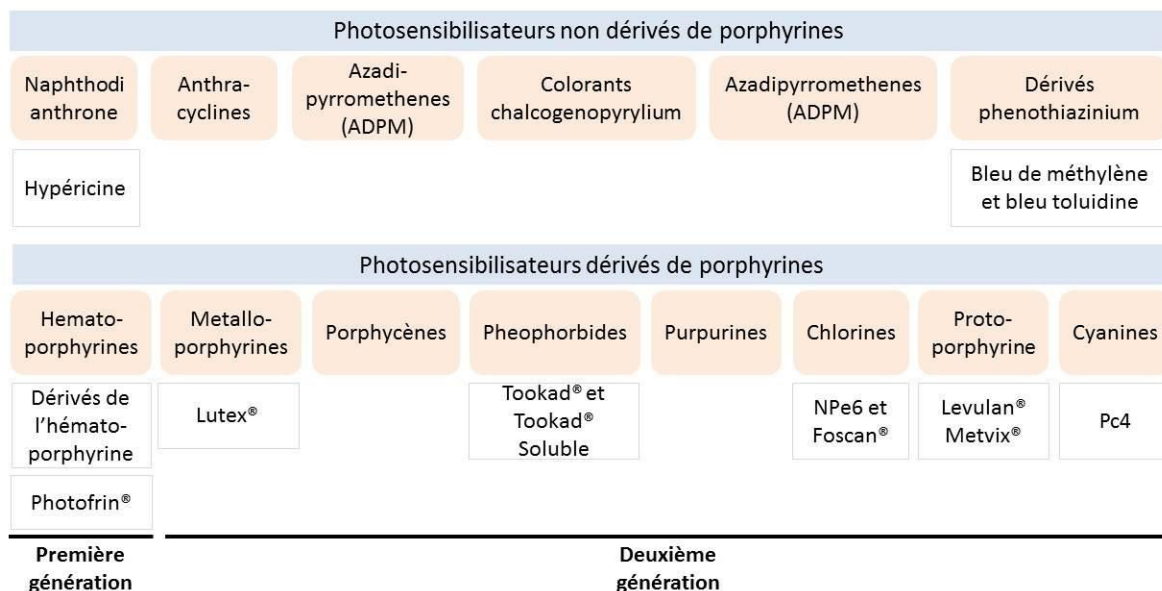


Figure I- 24- Classification des photosensibilisateurs.

Les PS sont séparés en 2 catégories : les PS non porphyriniques et les PS porphyriniques divisés en 3 sous-classes (première, deuxième et troisième générations).

II.4.1. Les PS non porphyriniques

Le développement de PS non porphyriniques pour application en oncologie, est bien moins considéré que le développement de PS porphyriniques, mais il représente tout de même une nouvelle approche pour la PDT. A ce jour, des PS cationiques tels que des colorants chalcogenopyrylium, les dérivés phenothiazinium et benzo[a]phenothiazinium (bleu de méthylène et bleu toluidine) sont les plus étudiés.

L'hypéricine (**Figure I-25**), quant à elle, est une quinone possédant un pic d'absorbance à 590 nm. La découverte est la caractérisation de l'hypéricine remontent aux années 80 durant les investigations des causes de l'hypéricisme, une photosensibilité cutanée retrouvée chez le bétail après l'ingestion de quantités importantes de plantes *Hypericum*. La PDT avec l'hypéricine est fortement dépendante de l'oxygène puisque celle-ci ne présente aucune photo-toxicité en conditions hypoxiques. Cependant, en présence normale d'oxygène, ce PS présente un fort rendement en oxygène singulet à l'origine de dommages directs au niveau de la tumeur mais également au niveau de la néovascularisation tumorale. La nature lipophile de l'hypéricine est responsable de sa localisation membranaire.

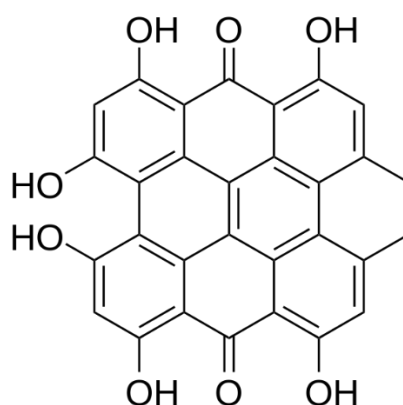


Figure I- 25- Structure de l'hypéricine.



En administration orale chez l'Homme, l'hypéricine présente une demi-vie de 34-42h, avec une accumulation maximale à 4-5h après administration. Des études *in vitro* et *in vivo* ont été menées quant aux effets de l'hypéricine en tant qu'agent anticancéreux (41) mais pour le moment aucun essai clinique n'a connu de succès. L'optimisation du traitement, et notamment l'amélioration de l'administration du PS, pourrait favoriser l'efficacité du traitement.

II.4.2. Les PS dérivés de porphyrines

II.4.2.1. Les PS de première génération

L'Hématoporphyrine dérivée (HpD) et ses dérivés tels que le Photofrin® font partie des PS de première génération. L'étude de l'HpD par chromatographie liquide haute performance (HPLC) réalisée par Dougherty (42) a montré qu'il s'agissait d'un mélange complexe de diverses porphyrines :

- 20% d'hématoporphyrine (Hp),
- 20 à 30% d'hydroxyéthylvinyldeutéroporphyrine sous deux formes isomériques (HvD1 et HvD2),
- 3 à 5% de protoporphyrine IX (PpIX),
- 50% des molécules restantes constituent un mélange d'oligomères sous formes d'éthers et/ou d'esters d'hématoporphyrine.

Le Photofrin®, une fraction enrichie en composés les plus actifs de l'HpD, aussi connu sous le nom de Porfimer sodium, est actuellement utilisé en clinique pour le traitement de nombreux types de cancer mais aussi pour le traitement du psoriasis et de maladies de la peau bénignes ou non.

En effet, dans le cadre de cancer pulmonaire de stade précoce, la PDT par Photofrin® est une méthode relativement récente, utilisée en traitement additionnel aux thérapies classiques que sont la chirurgie, la chimiothérapie ou la radiothérapie. Chez des patients atteints d'un cancer pulmonaire non à petites cellules et susceptibles d'être candidats pour une chirurgie, 12 patients sur 13 obtiennent une rémission complète dont 10 présentant une réponse dès le traitement initial et 2 qui ont nécessité un second traitement par PDT pour obtenir une réponse complète (43). Dans une étude menée chez 11 patients ayant un cancer pulmonaire non à petites cellules inopérables de stade I, une rémission a été observée chez 10 d'entre eux. Chez le 11^{ème} patient, ainsi que chez 11 patients sur 15 ayant ce même cancer mais à un stade plus avancé (stade III), une réponse partielle au traitement par la PDT a été observée (44).

De plus, 75-80% des patients atteints d'un cancer de la vessie présentent des tumeurs superficielles, faisant de la PDT une alternative de traitement idéal pour ce type de tumeurs. Une étude a été menée chez 58 patients présentant un carcinome transitionnel superficiel résistant (TCC) ou un carcinome in situ réfractaire (CIS) de la vessie dont la chimiothérapie ou l'immunothérapie ont été contre-indiquées. Après avoir été acceptés au traitement par ablation, les patients reçoivent un traitement par PDT avec le Photofrin®. Une réponse thérapeutique est retrouvée dans 84% des cas pour un TCC et 75% des cas pour un CIS. Après un suivi de 50 mois, 31 patients ne présentent aucun signe de cancer (45). Cependant, la PDT par Photofrin® étant à l'origine d'une inflammation associée à la réponse immune, des effets secondaires tels que l'augmentation de la fréquence urinaire, une douleur supra-pubienne, des spasmes et parfois une contraction permanente de la vessie, sont générés par la dose de lumière appliquée au niveau de la vessie. En effet, les doses de lumière nécessaire à l'activation du Photofrin® semblent être patients-dépendantes.

Effectivement, ces PS de première génération présentent de nombreux inconvénients : une faible sélectivité des cellules tumorales, une clairance lente à l'origine d'une photosensibilité cutanée



pouvant durer plusieurs semaines (4 semaines pour le Photofrin®), une faible absorption dans le rouge ne permettant pas de traiter les tumeurs profondes, une composition complexe (le Photofrin® contient 60 composants différents).

Dans les années 80, l'ensemble de ces inconvénients a permis de mettre en évidence les propriétés idéales d'un photosensibilisateur (46) :

- une composition constante (idéalement pure et facilement synthétisable),
- une toxicité nulle ou faible à l'obscurité,
- une sélectivité tumorale, une clairance rapide pour une photosensibilité courte des tissus sains,
- un rendement quantique en état triplé élevé,
- une absorption dans le rouge permettant de traiter des tumeurs plus profondes.

II.4.2.2. Les PS de deuxième génération

Une nouvelle classe de PS dite de seconde génération a vu le jour grâce à différentes modifications chimiques apportées à la structure tétrapyrrolique des porphyrines. Les améliorations apportées ont conduit à une meilleure pureté des PS leur conférant ainsi une stabilité plus importante, une faible toxicité à l'obscurité, une absorption dans le rouge et un meilleur rendement quantique en oxygène singulet (47). Nombreux de ces PS sont d'origine synthétique mais certains sont synthétisés à partir de substances naturelles.

II.4.2.2.1. Le Foscan®

La molécule de Foscan®, ou méso-tétra hydroxyphénylchlorine (mTPHC), est issue de la réduction d'une double liaison de la porphyrine correspondante (**Figure I-26**). Commercialisé par Biolitec AG (Iena, Allemagne), le Foscan® a été approuvé en 2001 par la communauté européenne pour le traitement des tumeurs de la tête et du cou n'ayant préalablement pas répondu à la radiothérapie ou à la chimiothérapie.

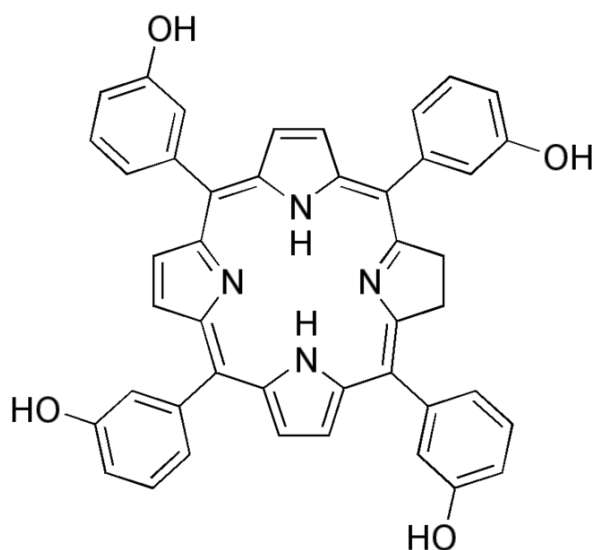


Figure I- 26- Structure de la méso-tétra hydroxyphénylchlorine (mTPHC) ou Foscan®



En 2004, appliquée chez 128 patients présentant ces indications, la PDT avec le Foscan® (0,15 mg/kg, IDL = 96h) a montré une augmentation significative de la qualité de vie des patients, en particulier dans le cas de tumeurs de taille inférieure à 10 mm (48). En 2010, sur 39 patients atteints de cancer de la tête et du cou en stade terminal, la PDT avec le Foscan® a montré une réponse complète chez 19 d'entre eux, une réponse partielle chez 2 d'entre eux, une stabilité de la maladie chez 5 patients, une progression de la maladie chez 5 d'entre eux et une évaluation des 8 patients restants n'a pas été possible (49). D'autres indications cliniques potentielles de la PDT avec le Foscan® ont été récemment décrites, et notamment dans le cadre de cancers primitifs de la prostate où le traitement par PDT avec le Foscan® a permis une diminution du taux de PSA chez les 6 patients traités (50) ou dans le cadre de cancers prostatiques en rechute (essai clinique de phase I) (51). Chez 14 patients présentant une récurrence de cancer prostatique après radiothérapie, la PDT avec le Foscan® et l'utilisation de fibres optiques par aiguilles périnéales, une diminution du taux de PSA a été retrouvée chez 9 patients et 5 patients présentaient des tumeurs non viables. Néanmoins, des effets secondaires tels qu'une incontinence ou encore des troubles sexuels ont été retrouvés chez 4 patients.

Le Foscan® répond aux critiques idéaux d'un PS : une pureté à plus de 99%, une faible toxicité à l'obscurité, une accumulation préférentielle dans le tissu tumoral, une sensibilité cutanée induite moins importante que le Photofrin® (2-4 semaines) et un pic d'absorption dans le rouge (652 nm). De plus, du fait de son effet cytotoxique important, des fluences moins importantes qu'avec d'autres PS peuvent être utilisées (10/20 J/cm² contre 100-200 J/cm²).

II.4.2.2.2. La NPe6 :

La molécule NPe6, ou mono-*i*-aspartyl chlorine 6, est commercialisée par Nippon Petrochemicals au Japon où son utilisation est approuvée dans le traitement de cancers pulmonaires localisés. Il s'agit d'une chlorine dérivée de la chlorophylle A, hydrophile grâce à son résidu aspartyl (**Figure I-27**). La NPe6 présente un pic d'absorption à 664 nm et son effet par PDT est optimal lorsque l'irradiation est effectuée 2 à 4 heures après l'administration du PS. Des essais cliniques de phase I et II ont montré une régression de tumeurs solides chez des patients réfractaires aux autres thérapies (52). Une étude pilote de phase III est en cours concernant une monothérapie d'hépatocarcinomes et également en complément thérapeutique à la chimiothérapie en cas de métastases de cancer colorectal au niveau du foie. Enfin, la NPe6 fait aussi l'objet d'études sur des patients atteints d'hypertrophie bénigne de la prostate (NCT00709488).

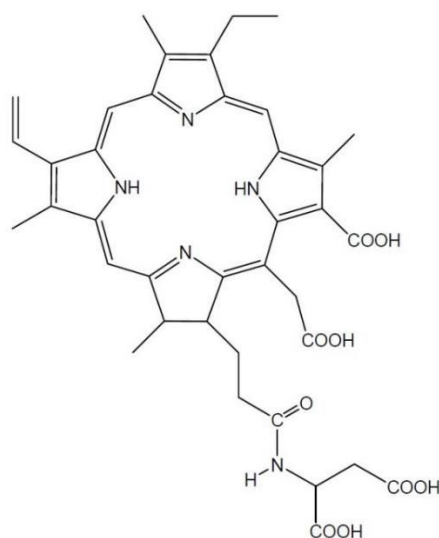


Figure I- 27 - Structure de la mono-*i*-aspartyl chlorine 6 ou NPe6.



II.4.2.2.3. Le Lutex®

La molécule de Lutex®, ou texaphyrine de lutétium, est commercialisée par Pharmacyclics aux Etats-Unis (**Figure I-28**). Elle présente un pic d'absorption à 732 nm qui lui permet une meilleure pénétration au sein des tissus et qui permet la diminution de l'absorption de la lumière par l'hémoglobine. Sa faible demi-vie dans le plasma (de l'ordre de 7h) suivant une injection intraveineuse génère une photosensibilité cutanée plus courte que les autres PS.

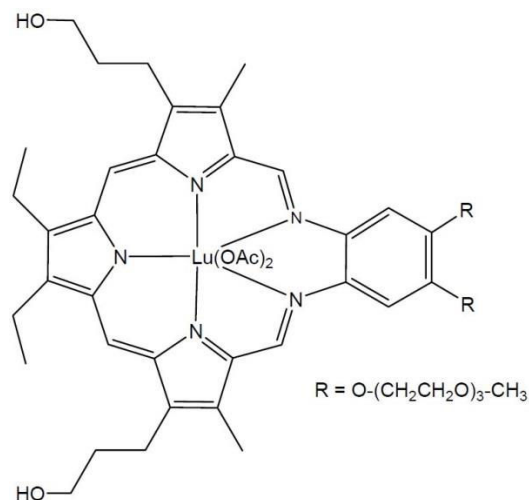


Figure I- 28- Structure de la texaphyrine de lutétium ou Lutex®

Le Lutex® a été utilisé lors d'essais cliniques sur des patients atteints d'adénocarcinomes prostatiques récurrents (53,54). Les premiers résultats ont montré que la PDT avec le Lutex® induisait une diminution du taux de PSA immédiatement après traitement, mais que celle-ci était transitoire (54).

II.4.2.2.4. Le Tookad®

Le Tookad® (bactéριοchlorophylle de palladium) ou WST09 et le Tookad® Soluble ou WST11, font partie de ces PS à durée de vie très courte dont l'activation est réalisée non plus au niveau tissulaire mais au niveau intravasculaire (**Figure I-29**).

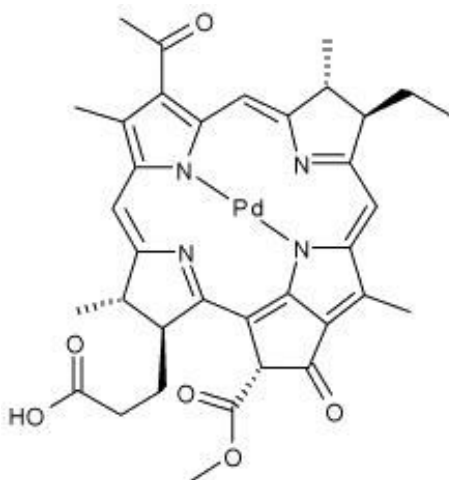


Figure I- 29- Structure du TOOKAD®.



En effet, cette activation appelée « Vascular Targeting PDT » ou VTP a pour but d'induire une ischémie tumorale par destruction de la néovascularisation à proximité de la source lumineuse par phénomènes de vasoconstriction et lyse endothéliale (**Figure I-30**). La faible distribution de **TOOKAD® Soluble** dans les tissus permet une clairance rapide dans la circulation sanguine. Par conséquent, la procédure mini-invasive **TOOKAD® Soluble-VTP** n'expose le patient à une phototoxicité cutanée que pendant les premières heures suivant le traitement. De plus, ce PS peut être utilisé en complément d'une hormonothérapie ou encore d'une radiothérapie.

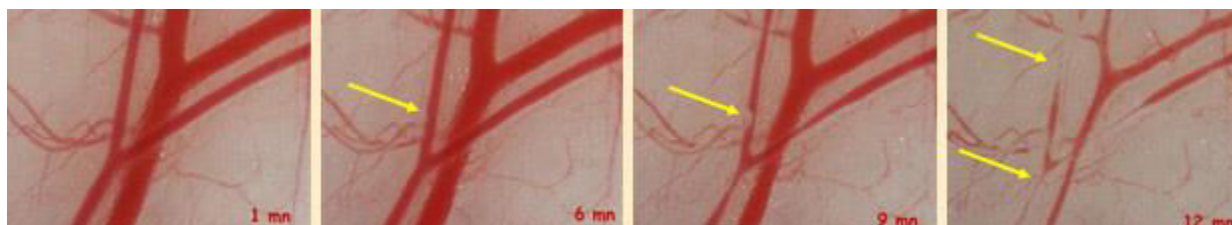


Figure I- 30- Mécanisme d'action du Tookad®.

Par phénomène de vasoconstriction et lyse endothéliale, le Tookad® permet la destruction de la néovascularisation tumorale. D'après Steba Biotech.

Le développement le plus avancé de WST11 est **TOOKAD® Soluble** pour les patients atteints de cancer de la prostate à un stade précoce, pour lequel des essais cliniques de Phase III sont en cours en Europe et programmés aux États-Unis et en Amérique Latine (55).

II.4.2.2.5. Les cyanines

Parmi les cyanines, de nombreux PS présentent un bon rendement quantique d'oxygène singulet. Des phthalocyanines (**Figure I-31**) et des naphthalocyanines présentant des ions aluminium, zinc (II), ou cuivre sont actuellement en cours d'étude pour le traitement des cancers de la peau (56) ou de la prostate. Aussi, certaines présentant des ions silicone telle que la phthalocyanine siliconée (Pc 4) est utilisée actuellement en essai clinique de phase I dans le traitement de lymphomes cutanés (57).

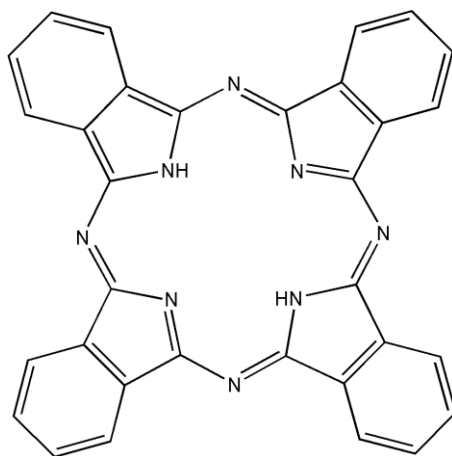


Figure I- 31- Structure d'une phthalocyanine.



II.4.2.2.6. Le Levulan®

L'acide 5-aminolévulinique, ou Levulan®, a été approuvé dans le traitement topique de kératoses actiniques du visage et du cuir chevelu en 1999, mais également dans le traitement de cancers de la peau non-mélaniques. L'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) est un précurseur porphyrinique impliqué dans la biosynthèse de l'hème. Il peut être métabolisé en protoporphyrine IX (PpIX) photoactivable au niveau de la mitochondrie (**Figure I-32**).

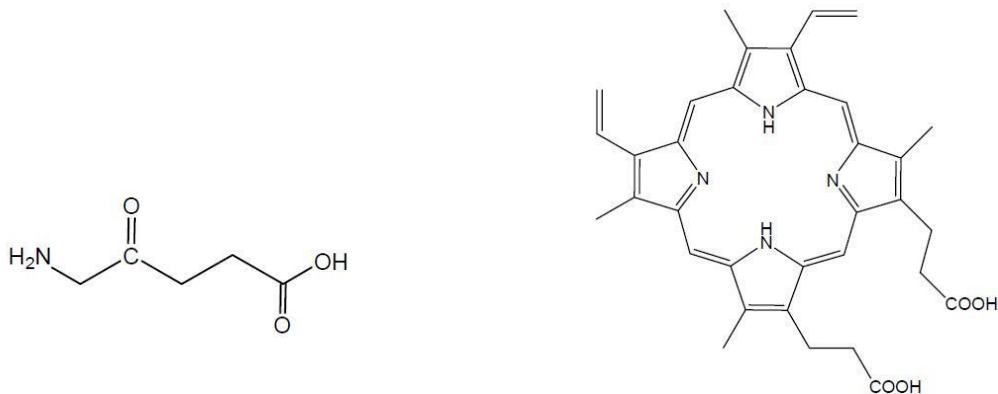


Figure I- 32- Structure de l'acide 5-aminolévulinique et de la protoporphyrine IX. L'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) est un précurseur de la protoporphyrine IX impliqué dans la biosynthèse de l'hème.

Dans la cellule, la biosynthèse de l'hème est finement régulée, de sorte que les concentrations en PpIX requises pour la photosensibilisation ne soient jamais atteintes physiologiquement. Néanmoins, l'administration exogène de 5-ALA induit une accumulation de PpIX due à une conversion d'ALA en PpIX plus importante que la conversion de PpIX en hème, du fait de l'incapacité de la ferrochélatase à convertir aussi rapidement la PpIX en hème, induisant ainsi des concentrations transitoires élevées de PpIX (**Figure I-33**).

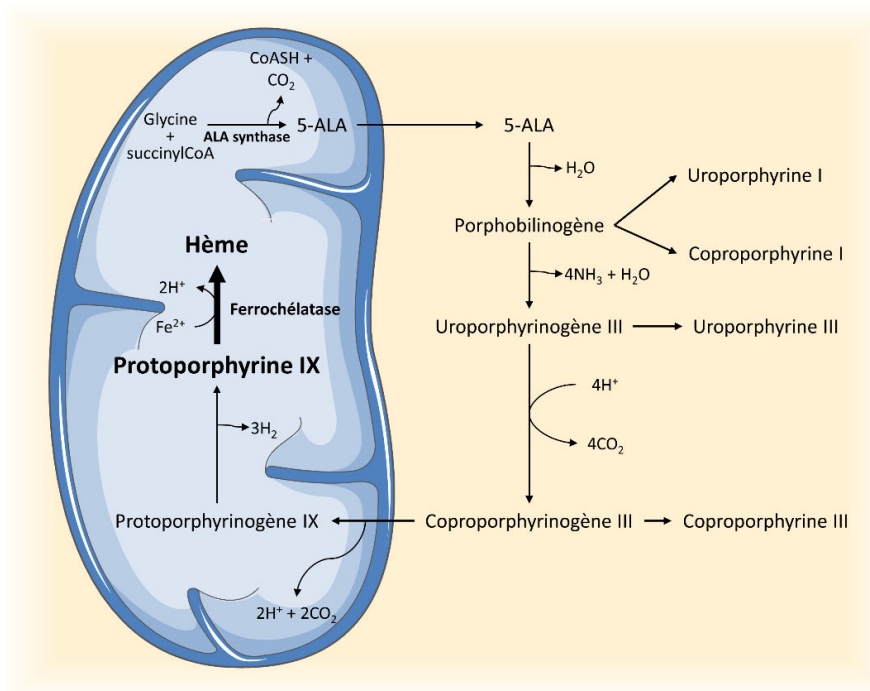


Figure I- 33- Biosynthèse de l'hème.

La première enzyme de la biosynthèse de l'hème, l'ALA synthase, est l'enzyme clé de la régulation de cette biosynthèse. Elle permet la formation de précurseurs de porphyrines (le 5-ALA et le porphobilinogène), la formation des porphyrinogènes, puis des porphyrines pour enfin produire l'hème par incorporation d'un atome de fer.



Le principal avantage de l'utilisation du 5-ALA est la possibilité de l'administrer par voie topique chez les patients porteurs de lésions superficielles. En effet, il a été montré que suite à une application topique du Levulan®, la PpIX est sélective à la fois vis-à-vis des tissus malins mais également des lésions néoplasiques en comparaison aux tissus sains. Plusieurs facteurs contribuent à cette sélectivité : la variation du niveau d'expression des enzymes impliquées dans la synthèse de l'hème, des faibles concentrations en fer au sein des cellules de carcinome réduisant le taux de conversion de PpIX en hème, des dommages au niveau de la couche cornée dans les tissus anormaux et la perméabilité vasculaire des tissus tumoraux.

Une fois au sein des cellules cancéreuses, la PpIX peut être activée par la lumière grâce à l'utilisation de longueurs d'onde appropriées : la PpIX possède un pic d'absorption maximal à 410 nm et quatre plus petits pics proches de 510, 540, 580 et 635 nm, permettant ainsi une irradiation via diverses sources lumineuses (**Figure I-34**).

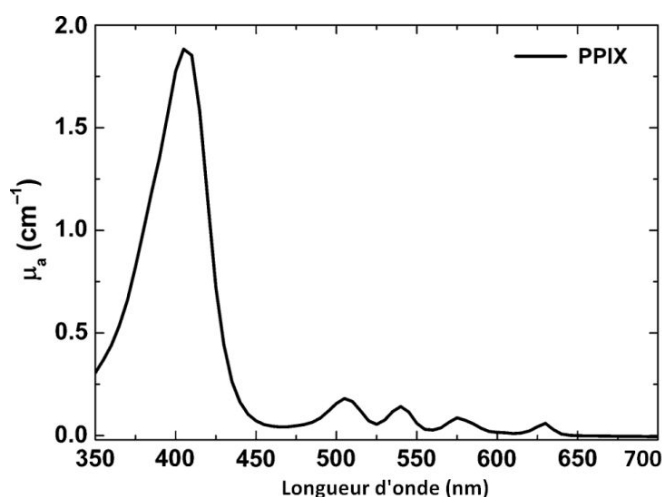


Figure I- 34- Spectre d'absorption de la Protoporphyrine IX.

La PpIX possède un pic d'absorption maximal à 410 nm et trois plus petits pics proches de 510, 540, 580 et 635 nm, permettant ainsi une irradiation via diverses sources lumineuses.

Un court intervalle de temps (entre 1 et 8 heures) est requis entre l'administration du Levulan® et l'accumulation maximale de PpIX dans les lésions, ceci étant fonction du mode d'administration (58). De plus, la PpIX produite est éliminée du corps dans les 24-48h (58).

Concernant le traitement de kératoses actiniques des mains, une comparaison entre la PDT avec le Levulan® et le 5-FU (traitement sélectif pour les kératoses actiniques utilisé en routine), a démontré une efficacité similaire entre les deux types de traitement : une réduction de 73% de la zone lésée avec la PDT-Levulan® contre une réduction de 70% avec le 5-FU (59). Aussi, cette étude a révélé qu'un unique traitement par PDT peut avoir une efficacité similaire à l'application 2 fois par jour de 5-FU pendant 3 semaines.

Néanmoins, ce traitement est souvent associé à quelques douleurs et a l'inconvénient de ne se limiter qu'aux lésions superficielles. C'est pourquoi des dérivés du Levulan® tels que le Metvix®, le Benzvix® ou encore le Hetvix®, ont été développés.

En effet, l'étude de la fluorescence du Metvix®, ou acide méthyl-aminolévulinique, a démontré une pénétration de l'ordre de 2 mm, 3h après son administration au niveau de cancer basocellulaire, soit une pénétration 2 fois plus importante que celle du Levulan (1 mm) (60). Ainsi, le Metvix® possède un avantage significatif sur le Levulan® quant à son efficacité au sein des tissus tumoraux, mais également quant à sa sélectivité vis-à-vis de ces tissus et la réduction de la douleur lors du traitement. Ces deux produits sont actuellement utilisés en routine dans les services d'oncologie dermatologique.



PS	Absorption (nm)	Localisation	Mécanisme d'action	Intervalle PS/irradiation	Application précliniques ou cliniques	Effets secondaires locaux	Effets secondaires systémiques	Approbation clinique
Hypéricine	595	Membrane RE, membrane golgienne	Cytotoxicité tumorale directe et dommages vasculaires	0,5-6h	<u>Tests précliniques</u> : cancer de la vessie, cancer nasopharyngé	-	Faibles dommages des tissus sains environnants	Non
Photofrin®	630	Appareil de Golgi, membrane plasmique	Dommages vasculaires et nécrose des cellules cancéreuses ischémiques	24-48h	<u>Approuvé pour le cancer</u> : De l'œsophage, endobrachial invasif, estomac et vessie, col de l'utérus	Erythème léger voire modéré	Photosensibilité, constipation	Oui
Foscan®	652	RE, mitochondrie	Dommages vasculaires, cytotoxicité tumorale directe	96h	<u>Approuvé</u> : cancer de la tête et du cou	Gonflement, saignement, ulcération, cicatrisation	Photosensibilité	Oui
NPe6	664	Lysosome, endosome	Stase vasculaire, cytotoxicité tumorale directe	2-4h	<u>Approuvé (au Japon)</u> : cancer pulmonaire précoce <u>Essais cliniques</u> : cancer hépatique et métastases	-	-	Oui (Japon)
Lutex®	732	Lysosome	Dommages vasculaires, cytotoxicité tumorale directe	3h	<u>Essais cliniques</u> : cancer de la prostate récurrent, cancer du col de l'utérus <u>Essais précliniques</u> : cancer du sein récurrent	-	Photosensibilité (minime)	Non
Tookad®	763	Vasculaire	Dommages vasculaires	15min	<u>Essai clinique</u> : cancer de la prostate	-	-	Non
Pc4	675	Mitochondrie	Cytotoxicité tumorale directe	24h	<u>Essai clinique</u> : lymphome cutané	-	Photosensibilité (minime)	Non
Levulan®	635	Mitochondrie, cytosol, membranes cytosoliques	Cytotoxicité tumorale directe	4-6h	<u>Approuvé</u> : kératoses actiniques	Piqûres, brûlures, démangeaisons, érythème	-	Oui
Metvix®	635	Mitochondrie, cytosol, membranes cytosoliques	Cytotoxicité tumorale directe	3h	<u>Approuvé</u> : kératoses actiniques, carcinome basocellulaire	Brûlures, rougeurs	-	Oui

Tableau 6 – Caractéristiques principales des photosensibilisateurs les plus utilisés.



II.4.2.3. Les PS de troisième génération

Afin d'améliorer leur sélectivité tumorale, certains PS de deuxième génération ont subi des modifications chimiques telles qu'une liaison ou un emballage au sein de molécules de transport. Ces motifs sont généralement des biomolécules (stéroïdes, des sucres, des amines, des acides aminés ou peptides) qui peuvent être reconnus spécifiquement par les cellules cancéreuses. De plus, les cellules tumorales possèdent à leur surface des antigènes spécifiques, non retrouvés au niveau des cellules saines, ce qui permet l'utilisation d'anticorps dirigés contre ces antigènes spécifiques comme vecteurs pour augmenter l'efficacité de ciblage des PS.

L'efficacité de la vectorisation des PS pour le ciblage des cellules tumorales a été démontrée, notamment dans le cas de cancer de la prostate. Ainsi le couplage du pyropheophorbide-a, un PS, à un inhibiteur spécifique du PSMA (Prostate Specific Membrane Antigen) entraîne une apoptose sélective des cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP, exposant PSMA, par rapport aux cellules PC-3, n'exposant pas PSMA (61). De la même façon, le couplage de l'hématoporphyrine avec un anticorps spécifique du PSMA (CYP-351) permet un ciblage précis des cellules LNCaP (62).

Sur la base de la chimie verte, le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de Limoges tend à développer de nouveaux PS d'origine naturelle capable de cibler spécifiquement les cellules tumorales.

II.4.2.3.1. Nouveaux PS synthétisés au sein du LCSN

Le LCSN développe des PS à partir de macrocycles tétrapyrroliques naturels d'origine animale ou végétale : les porphyrines sont synthétisées à partir de l'hémoglobine présente chez les animaux (**Figure I-35**) alors que les chlorines sont produites à partir de chlorophylles présentes chez les végétaux. Cette étude s'intéresse davantage à la synthèse de porphyrines.

Le groupe prosthétique de l'hémoglobine est la protoporphyrine de fer (II) ou hème. Il constitue le dérivé porphyrinique le plus abondant chez les animaux supérieurs. La chloroporphyrine de fer (III) résulte de l'oxydation du fer (II) lors de son extraction.

La protohème est obtenue à partir du sang selon l'une des deux méthodes suivantes :

- La méthode de Fischer : proposée par Fischer en 1955, cette méthode est devenue classique pour l'obtention de la protohème. Elle consiste à chauffer du sang défibriné en milieu acide, puis à isoler la protohème (par filtration ou centrifugation) lors du refroidissement du mélange. La purification est réalisée par recristallisation, ce qui permet d'obtenir 2,8 à 3,6 g de protohème pure par litre de sang
- La méthode de Labbe et Nishida basée sur l'usage de chlorure de Strontium, afin d'éliminer la majorité des protéines par filtration à chaud. La protohème cristallise ainsi dans le filtrat en cours de refroidissement, puis elle est purifiée également par recristallisation. Les rendements obtenus par cette méthode sont sensiblement identiques que ceux obtenus par la méthode de Fischer.

La protoporphyrine IX est obtenue quant à elle par simple démetalation de la protohème IX.



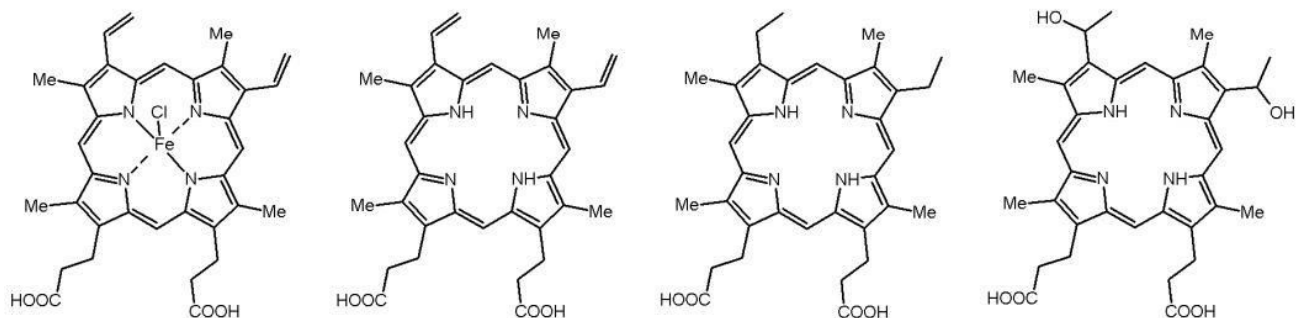


Figure I- 35- Structure des porphyrines synthétisées à partir de sang.

De gauche à droite : la protohème IX, la protoporphyrine IX, la mésoporphyrine IX et l'hématoporphyrine IX

A partir de ces porphyrines, le LCSN a pu développer plusieurs types de PS : des PS glycoconjugués, des PS à motifs polyaminés et des PS à motifs RGD.

II.4.2.3.2. Les PS glycoconjugués

Les méso-porphyrines glycosylées sont reconnues pour le ciblage des lectines qui sont des récepteurs transmembranaires surexprimés par certaines cellules cancéreuses. Généralement, l'unité glucidique est fixée sur la ou les positions méso du macrocycle par l'intermédiaire d'un espaceur [55] (**Figure I-36**). Les premiers résultats *in vitro* ont montré que seuls les macrocycles substitués par deux ou trois monosaccharides présentent une phototoxicité importante. Néanmoins le remplacement d'un monosaccharide par un disaccharide diminue voire supprime totalement l'action phototoxique. [56]

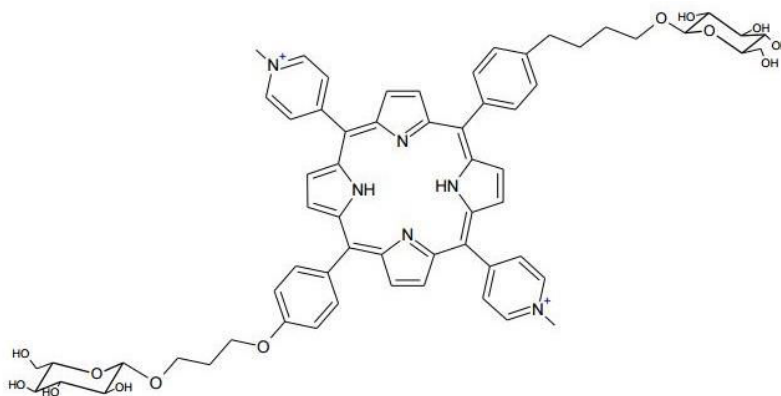


Figure I- 36- Exemple de méso-porphyrines glycosylées phototoxiques préparées au LCSN

II.4.2.3.3. Les PS à motifs RGD

Le LCSN a pu mettre en place des méso-porphyrines glycosylées portant un ou plusieurs acides aminés (alanine). Cette approche permet de cibler les sites de transport des acides aminés essentiels. [60] La présence de sucres à ce niveau permet non seulement la reconnaissance mais également une augmentation de la biodisponibilité du PS. Ainsi, un photosensibilisateur substitué par trois résidus glucosyles et portant un RGD (Arg-Gly-Asp) cyclisé ont été synthétisés pour la première fois au sein du laboratoire (**Figure I-37**).



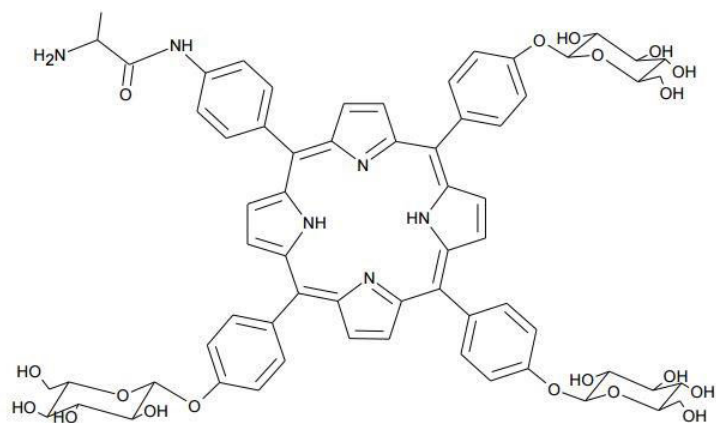


Figure I- 37- Porphyrine triglucosylée portant un résidu alanine

II.4.2.3.4. Les PS à motifs polyaminés

Des méso-tritolylporphyrines et protoporphyrines ont été fixés à des motifs spermidine ou spermine. L'objectif de cette synthèse est de viser la métabolisation de ces polyamines qui est anormalement élevé chez les cellules malignes dont l'activité mitotique est intense. Ces composés ont présenté un effet photocytotoxique sur les mélanomes.

II.5. Intérêt des polyamines dans le ciblage des cellules tumorales

II.5.1.1. Structure et rôle des polyamines

Les polyamines (PA) sont des molécules de faible poids moléculaire constituées d'une chaîne carbonée (aliphatique) possédant au minimum deux groupements aminés qui sont chargés positivement à pH physiologique. Les 3 polyamines principalement retrouvées chez les eucaryotes sont la putrescine, la spermidine et la spermine (**Figure I-38**).

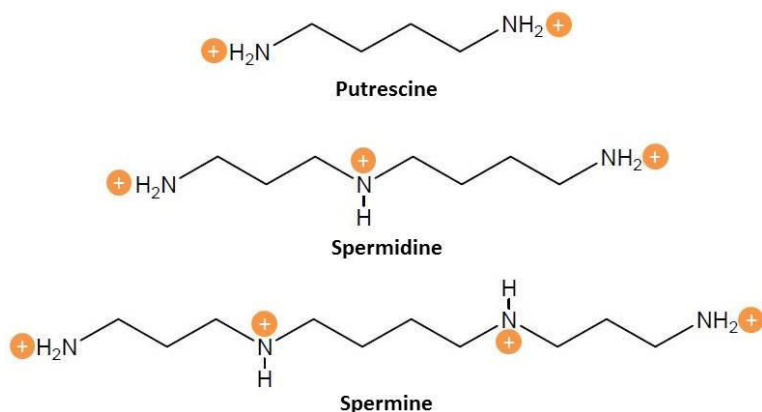


Figure I- 38- Structures et charges électriques des 3 principales polyamines.

Les polyamines telles que la putrescine, la spermidine et la spermine possèdent respectivement 2, 3 et 4 sites de cationisation.

Les polyamines présentent un intérêt thérapeutique du fait de leur implication dans les processus de viabilité cellulaire. Leur rôle dépend en grande partie de leurs interactions électrostatiques avec des macromolécules chargées négativement telles que les acides nucléiques (ARN et ADN), les nucléotides (ATP), les protéines et les phospholipides membranaires.



Ces différents types d'interaction permettent aux polyamines de jouer un rôle dans la croissance cellulaire. En effet, leur synthèse est finement ajustée selon les différentes phases du cycle cellulaire : elles peuvent affecter l'initiation de la synthèse d'ADN, exercer un effet stabilisant sur l'ADN, interagir avec l'ARN et stimuler la synthèse protéique. De plus, il a été démontré que le taux intracellulaire de polyamines est plus important dans les cellules en prolifération, telles que les cellules cancéreuses, que dans les cellules quiescentes.

En fonction de son nombre de charges, chaque polyamine possède une activité qui lui est propre : plus le nombre de charges est important et plus l'énergie de liaison est importante. La spermine est connue comme la polyamine la plus efficace pour influencer divers processus biologiques.

II.5.1.1.1. Liaison à l'ADN

La spermine joue un rôle spécifique dans l'organisation structurale et la régulation d'activité de la chromatine. *In vitro*, elle permet la condensation de l'ADN en particules sphéroïdes, l'association des sous unités ribosomiques et intervient à différentes étapes de la synthèse protéique. Elle protège également l'ADN des endonucléases induites lors de l'apoptose.

La capacité des PA à se lier aux acides nucléiques et tout spécialement à l'ADN est certainement la propriété la plus importante des PA. Elles neutralisent les charges des groupes phosphate, interagissent avec les bases et entrent à l'intérieur des boucles mineures de la double hélice (63).

II.5.1.1.2. Cycle cellulaire

Des études immunocyto-chimiques sur la spermidine et la spermine ont montré que les PA sont associées lors de la mitose à des chromosomes hautement compactés, et que ces PA peuvent avoir un effet plus stabilisant que régulateur sur la structure de la chromatine pendant le cycle cellulaire, permettant ainsi la progression des cellules dans la phase S du cycle (64).

La déplétion en polyamines altère l'expression de nombreux gènes de croissance. En effet, une déplétion en PA induit l'arrêt du cycle cellulaire par l'induction d'inhibiteurs de Cdk p21WAF1/CIP1 et p27KIP1 via des mécanismes généralement dépendants de p53. Une augmentation de l'expression d'enzymes de synthèse de PA inhibe l'expression de p27KIP1, confirmant ainsi le rôle de p27KIP1 dans le contrôle du cycle cellulaire par les polyamines (65). Les PA agissent également sur l'expression des différentes cyclines régulatrices du cycle cellulaire et notamment les cyclines A, B1 et D1.

II.5.1.1.3. Apoptose

Paradoxalement, il apparaît que les PA peuvent agir en tant que promoteurs, modulateurs et protecteurs de l'apoptose.

Sous certaines conditions, les PA ont des effets toxiques sur les cellules. De fortes concentrations anormales en polyamines sont délétères sur la croissance cellulaire et peuvent conduire à la mort de la cellule par apoptose (66). Aussi, une déplétion en PA par utilisation de la DFMO (α -difluorométhylornithine) engendre une activation du facteur de survie NF- κ B prêtant ainsi aux PA un rôle promoteur d'apoptose (67).



A l'inverse, une déplétion en PA induite par une surexpression de la spermidine/spermine acétyltransférase (SSAT) conduit à un arrêt du cycle cellulaire et à l'induction du processus apoptotique via sa voie intrinsèque suggérant que dans ces conditions, les PA jouent plutôt un rôle protecteur de l'apoptose (68).

II.5.2. Sources et métabolisme des polyamines

A l'exception des hématies, toutes les cellules de l'organisme sont capables de métaboliser des polyamines via une voie de biosynthèse finement régulée. En effet, l'homéostasie intracellulaire des polyamines est maintenue par l'intermédiaire de mécanismes complexes impliquant une biosynthèse endogène à partir d'acides aminés précurseurs, une rétro-conversion oxydative, un catabolisme terminal ainsi qu'un système de transport permettant soit l'utilisation de polyamines de sources extracellulaires soit l'excrétion des polyamines intracellulaires.

II.5.2.1. Sources endogènes des polyamines et voie de biosynthèse

La biosynthèse des polyamines fait intervenir 4 enzymes spécifiques : l'ornithine décarboxylase (ODC) qui catalyse la formation de putrescine à partir de l'ornithine, un acide aminé non essentiel provenant du cycle de l'urée ou de l'alimentation, la S-adénosylméthionine décarboxylase (SAM-DC) qui fournit les radicaux aminopropyle nécessaires à la synthèse de spermidine et de spermine à partir de la S-adénosylméthionine et la spermidine et la spermine synthétases qui, comme leur nom l'indique, permettent la synthèse respective de spermidine et de spermine.

La voie de rétro-conversion des polyamines, qui n'existe que dans certains tissus, permet de régénérer de la putrescine à partir de spermidine et de la spermidine à partir de spermine fait intervenir 2 enzymes : la spermidine/spermine acétyltransférase (SSAT) et la polyamine oxydase (PAO) (**Figure I-39**).

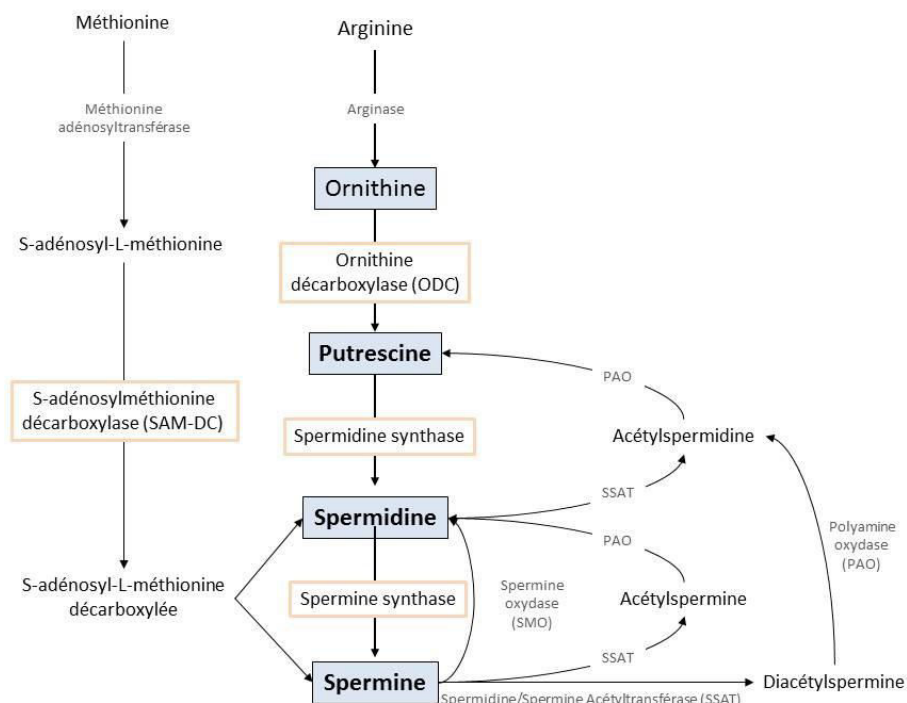


Figure I- 39- Voie de biosynthèse et de rétro-conversion des polyamines.

La biosynthèse des polyamines se fait à partir de l'ornithine, un acide aminé provenant du cycle de l'urée ou de l'alimentation, qui va être sujet à l'action d'enzymes décarboxylases et de synthétases. La voie de rétro-conversion des PA, présente que dans certains tissus, permet de régénérer la putrescine à partir de la spermidine et de la spermine qui vont être soumises à l'action d'enzymes acétyl-transférases et d'oxydases.



L'ornithine décarboxylase (ODC) est l'enzyme clé de la biosynthèse des polyamines. Il s'agit d'une enzyme PLP (pyridoxal phosphate-dependent) qui décarboxyle l'ornithine pour former la putrescine. Sous forme monomérique, elle ne présente aucune activité enzymatique ; c'est une fois sous forme d'homodimère que deux sites actifs se localisent à l'interface des 2 sous-unités. Sa dégradation n'est pas régulée à un taux constant mais est dépendante de la concentration intracellulaire en polyamines. En effet, ODC est sous le contrôle de deux types de protéines : les protéines Antizyme (AZ) dont la synthèse est stimulée par les polyamines, induisent une dégradation de ODC par le protéasome indépendamment de l'ubiquitine, et les protéines inhibitrices des antizymes (AZI), qui inhibent la capacité des AZ à favoriser la dégradation de ODC (69).

II.5.2.2. Sources exogènes des polyamines

Outre la régulation enzymatique, l'homéostasie des polyamines dépend également de leur système de transport ou PTS (Polyamine Transport System). Ce dernier permet l'incorporation de polyamines circulantes, principalement véhiculées dans le sang par les érythrocytes. Les polyamines captées par ce PTS sont de 2 types : celles provenant de l'alimentation et celles relarguées par la flore microbienne ; c'est pourquoi, les cellules intestinales constituent une interface doublement importante, du fait de leur contact avec les 2 types de polyamines.

II.5.2.2.1. Les polyamines provenant de l'alimentation

Tous les aliments contiennent des polyamines, mais en quantité différente selon leur degré de fermentation, leur mode de préparation ou de cuisson. Dans des conditions physiologiques normales, les aliments ingérés sont la principale source luminale de polyamines chez les mammifères. Les polyamines naturelles sont capables de couvrir les besoins journaliers, le renouvellement ainsi que la croissance cellulaire. En effet, leur rapide captation au niveau de l'épithélium intestinal et leur distribution à l'ensemble de l'organisme via la circulation sanguine épargnent le coût d'une synthèse *de novo*.

II.5.2.2.2. Les polyamines relarguées par la flore intestinale

Chez l'adulte, la flore intestinale est composée d'environ 10^{14} bactéries, ce qui constitue une source quantitative et qualitative de polyamines étant donné que ces bactéries sont capables d'en produire en quantité considérable *in vivo*. La putrescine et la spermine sont les amines produites en majorité par la microflore bactérienne.

La voie de biosynthèse endogène des polyamines et leur système de transport sont des événements associés, favorisés par les mêmes stimuli. En effet, en cas de concentration excessive en polyamines dans la cellule, l'import est réprimé et le relargage est favorisé. En revanche, en cas de concentration intracellulaire insuffisante, une activation plus importante du PTS a lieu.

II.5.2.2.3. Le système de transport des polyamines

Bien que le système de transport des polyamines soit relativement mal caractérisé chez les mammifères, il reste certain qu'il joue un rôle important dans l'homéostasie des polyamines. Du fait de l'importance des apports en polyamines par le régime alimentaire et la flore intestinale, une meilleure compréhension du fonctionnement de ce système de transport des polyamines semble indispensable pour exploiter plus clairement le rôle des polyamines comme moyen thérapeutique.



Plusieurs études ont montré une corrélation entre le PTS et l'activité enzymatique de l'ornithine décarboxylase (ODC). En effet, les protéines AZ et AZI sont capables respectivement de réprimer et d'activer à la fois l'activité enzymatique de l'ODC et le PTS. Plus exactement, les protéines AZ inhibent la consommation en polyamines et stimulent leur excrétion par un mécanisme qui reste encore inconnu. De plus, il a été démontré récemment que l'expression de AZI peut être réprimée par les polyamines.

Le lien étroit entre les protéines AZ et les polyamines suggère que celles-ci peuvent jouer un rôle dans l'inhibition de la prolifération et la différenciation cellulaires. En effet, une surexpression des protéines AZ dans des cellules en culture ou chez des modèles murins a montré que ces protéines agissent comme régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire et du développement tumoral, inhibition corrélée avec l'induction du phénomène d'apoptose.

Actuellement, il existe 3 modèles de système de transport des polyamines (**Figure I-40**). Le premier modèle suggère l'existence d'un transporteur membranaire, encore non identifié, alimenté par le potentiel membranaire : une polyamine perméase. Les polyamines accumulées au niveau cytoplasmique seraient ensuite prises en charge par des vésicules semblables aux vésicules d'endocytose tardive, sous le contrôle d'un gradient ATPase et de protons vacuolaires. Ainsi, dans ce modèle, les vésicules ne sont pas en lien direct avec le transporteur membranaire. Néanmoins, ce modèle tient compte du fait que le contenu global de polyamines dans la cellule est élevé malgré un niveau de polyamines cellulaires libres faible. En outre, ce modèle suggère un système dans lequel les niveaux de polyamines dans la cellule peuvent changer rapidement grâce à la libération des polyamines séquestrées.

Le second modèle décrit un mécanisme par lequel la spermine se lie aux groupements héparane sulfate du glypican-1 (GPC-1) à la surface des cellules et est internalisée. Une fois dans la cellule, la spermine est libérée par un processus d'oxydation du NO.

Un troisième mécanisme de transport de polyamines émet l'hypothèse d'une intériorisation des polyamines dépendante de la cavéoline-1 suite à leur fixation au niveau d'un récepteur encore inconnu. Dans ce modèle, la putrescine est libérée des vésicules à travers un transporteur SLC3A2 et la réaction avec l'oxyde nitrique synthase 2 (NOS2) déstabilise les complexes spermine-récepteur.



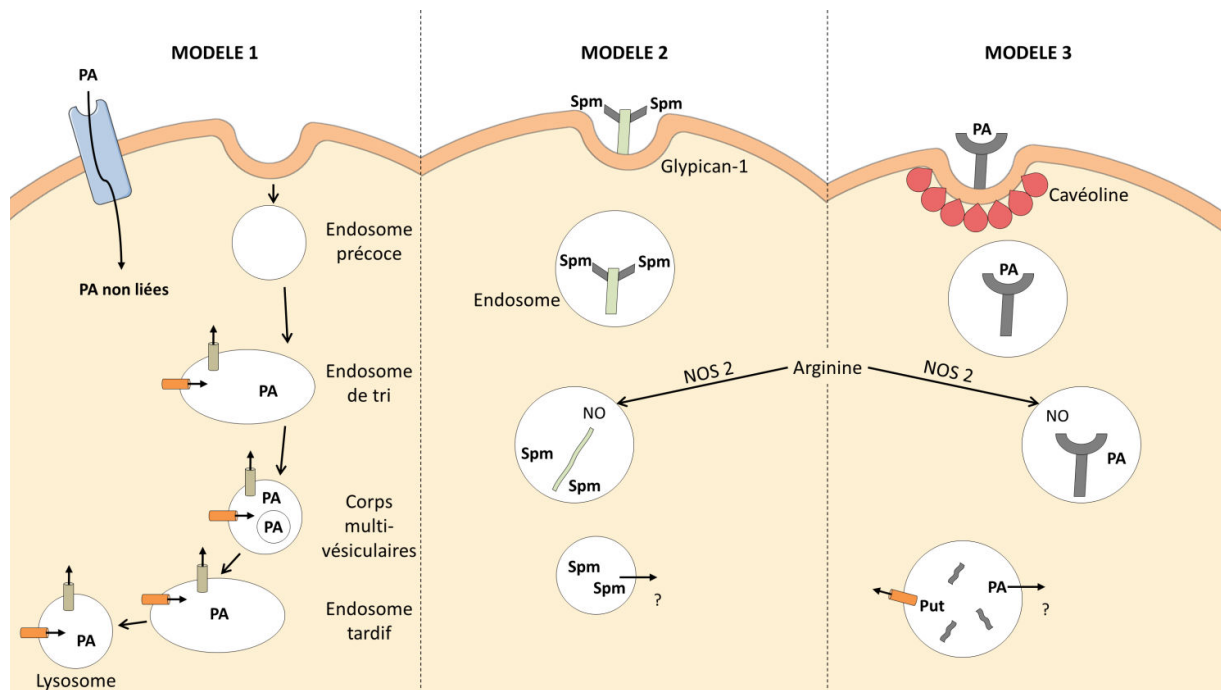


Figure I- 40- Modèles théoriques du système de transport des polyamines (PTS).

3 modèles théoriques de PTS existent : le premier mettant en jeu un récepteur membranaire spécifique encore non identifié en tandem avec des vésicules semblables aux vésicules d'endocytose, le second décrivant la reconnaissance par la spermine des groupements héparane sulfate du GCP-1 et le troisième annonçant la reconnaissance des PA par un récepteur membranaire spécifique encore inconnu, suivie de l'intériorisation des PA dépendante de la cavéoline-1.

Ainsi, de nombreux mécanismes ont été proposés pour expliquer ce processus de transport des polyamines. Néanmoins, aucun n'a identifié tous les composants moléculaires impliqués, compatibles avec les données biochimiques observées. L'identification de ces composants est cruciale pour permettre la pleine exploitation de ce système PTS quant à l'utilisation de médicaments ciblant le métabolisme des polyamines et quant à l'utilisation des polyamines comme vecteur des médicaments pour cibler les cellules d'intérêt telles que les cellules cancéreuses dans le cadre de la PDT.

II.5.2.3. Polyamines et cancer

II.5.2.3.1. Les polyamines, rôle clé en cancérologie

Le rôle décisif des polyamines dans la prolifération cellulaire néoplasique, dans la transformation tumorale et leur forte production intra-tumorale démontrent leur importance en cancérologie.

En effet, les polyamines sont associées au cancer depuis que Russel et Snyder ont démontré une augmentation de l'activité de ODC dans les tumeurs (70), puis les PA ont été retrouvées en abondance dans les urines et le sang de plusieurs patients atteints de cancer (71) permettant de faire de ces PA un outil de détection précoce du cancer. En effet, dans le cadre du cancer de la prostate, le taux de spermidine constitue un index de la prolifération cellulaire alors que le taux de spermine est un index de la progression des métastases et de l'échappement tumoral. De plus, des modèles de souris transgéniques exprimant fortement le gène ODC au niveau de la peau ont développé des tumeurs de la peau (72) et une réduction du niveau de PA pouvait limiter la tumorigenèse (73).



Ainsi, une inhibition du métabolisme des polyamines apparaît comme un moyen thérapeutique de lutter contre la prolifération des cellules tumorales. C'est pourquoi la DFMO (α -DiFluoroMethylOrnithine), un inhibiteur de ODC, est l'objet de plusieurs études dans lesquelles il inhibe la prolifération de cellules de mammifères mais aussi dans lesquelles il révèle une activité anticancéreuse chez des modèles murins (74). En effet, chez l'animal porteur d'adénocarcinome de la prostate Dunning Mat Ly-Lu, l'administration conjointe de DFMO, de néomycine (pour la décontamination bactérienne du tractus digestif) et d'une alimentation synthétique dépourvue en PA induit une forte inhibition de la progression tumorale (75).

II.5.2.3.2. Les polyamines, outils de vectorisation

Comparativement à son homologue histologique normal, un tissu tumoral capte plus intensément les polyamines présentes dans le milieu extracellulaire. Les cellules cancéreuses étant capables de reconstituer rapidement leur pool intracellulaire de PA en les captant dans leur environnement immédiat, l'inhibition de la synthèse intracellulaire de polyamines ne peut donc à elle seule inhiber la progression tumorale maligne. Néanmoins, cette capacité des cellules tumorales à capter préférentiellement les PA grâce au PTS fait des PA un outil intéressant quant au ciblage de ces cellules.

En effet, cette dernière caractéristique du PTS a permis de proposer la vectorisation de drogues cytotoxiques connue grâce à des polyamines permettant ainsi à ces drogues de cibler plus spécifiquement les cellules tumorales. Par conséquent, une telle approche est très justement comparée au cheval de Troie de la mythologie grecque : les PA, nécessaires à la prolifération des cellules tumorales, servent de vecteurs aux drogues anticancéreuses qui ciblent ces cellules via le PTS, et permettent ainsi de limiter l'effet toxique de ces drogues sur les cellules normales, effet retrouvé en chimiothérapie conventionnelle.

L'exemple de conjugué drogue-polyamines le plus cité est certainement la combinaison de l'agent anticancéreux, le chlorambucil, à la spermidine (76). Le chlorambucil est utilisé dans le traitement de leucémies lymphoïdes chroniques, de lymphomes et de cancers avancés des ovaires et du sein. Afin de montrer si ce conjugué utilise le PTS, sa cytotoxicité est comparée dans des cellules non traitées ou prétraitées avec du DFMO. Ce prétraitement permettrait d'inhiber la biosynthèse endogène des PA et donc d'augmenter l'activité du PTS dans ces cellules. Ainsi, toute augmentation de cytotoxicité serait la preuve indirecte que le conjugué utilise le PTS comme porte d'entrée vers la cellule. Le couplage de la spermidine au chlorambucil augmente de 35 fois son efficacité. Cependant, la neurotoxicité présentée par ce conjugué conduit à l'échec des études complémentaires. Néanmoins, celui-ci a permis de démontrer que le PTS pouvait potentiellement être exploité comme moyen de délivrer des drogues au sein de cellules cibles, telles que les cellules cancéreuses.

Depuis, plusieurs molécules actives ont été fixées à des polyamines en vue d'un meilleur ciblage tumoral : l'acridine (77) et les anthracènes (78), une fois couplés aux polyamines, montrent une augmentation de leur capacité de liaison à l'ADN et d'inhibition de la topoisomérase II. L'utilisation du PTS pour l'entrée de ces deux types de conjugués dans la cellule a été mise en évidence.

De plus, selon la polyamine choisie comme vecteur, des différences d'affinité pour le PTS et des différences de cytotoxicité ont été remarquées. En effet, en dépit du fait que le conjugué acridine-spermine ait une plus forte affinité pour le PTS, son entrée dans la cellule apparaît faible. Aussi, le conjugué anthracène-spermidine, bien plus cytotoxique que le conjugué anthracène-spermine, présente une affinité pour le PTS moins importante (79). Des études par microscopie ont



mis en évidence l'internalisation des composés couplés à la spermidine alors que ceux avec la spermine étaient liés plus fortement à la cellule sans entrer dans celle-ci (80). Cette différence de capture de ces composés s'expliquerait par le nombre de charges positives plus importants sur la spermine, favorisant ainsi la liaison à d'autres composés de la membrane plasmique, retardant ainsi son transport. Enfin, ces composés sont capables de déclencher la mort des cellules via l'induction du phénomène d'apoptose, mécanisme pouvant être dû aux dommages à l'ADN et au stress oxydatif (81,82).

II.5.2.3.3. Les polyamines, vecteurs de PS en PDT

Compte tenu du rôle important des PA dans le ciblage des cellules tumorales, la fixation de telles structures sur des PS devrait assurer la reconnaissance de tumeurs, réduisant ainsi les problèmes liés au manque relatif de sélectivité qui caractérise la plupart des porphyrines actuellement développées dans le cadre de la PDT. Sur la base de ces résultats, le LCSN s'est attaché à développer la synthèse de porphyrines portant une ou plusieurs polyamines.

Dans le cadre de cette nouvelle stratégie de ciblage des cellules tumorales, la protoporphyrine IX a été couplée à deux polyamines : la spermidine et la spermine. Ces nouvelles structures auront l'avantage de posséder deux vecteurs (soit deux spermidines, soit deux spermines) pour le ciblage des cellules cancéreuses et leur caractère amphiphile se trouvera augmenté. Il s'agit donc de la protoporphyrine IX dispermidinée (PpIX-dSd) (**Figure I-41**) et de la protoporphyrine IX disperminée (PpIX-dSm) (**Figure I-42**).

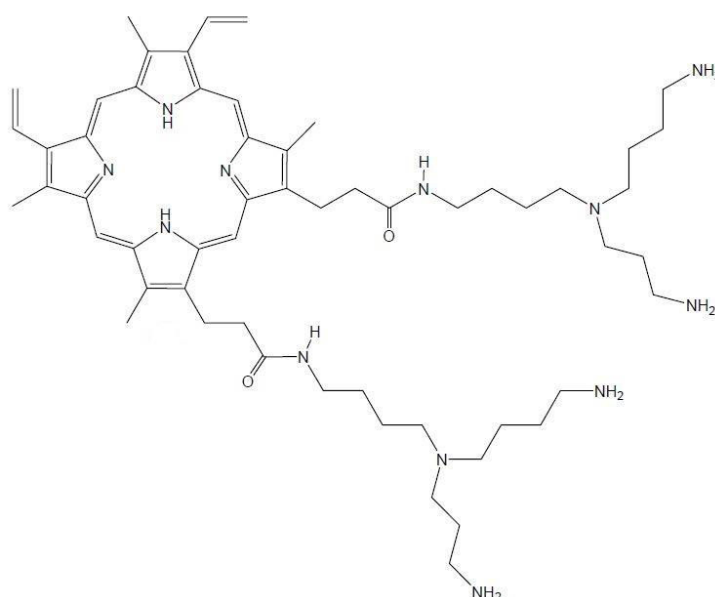


Figure I- 41- Structure de la protoporphyrine IX dispermidinée (PpIX-dSd).

La PpIX, formée de 4 noyaux pyrroliques, est vectorisée par deux molécules de spermidine à l'aide de deux bras espaceurs.



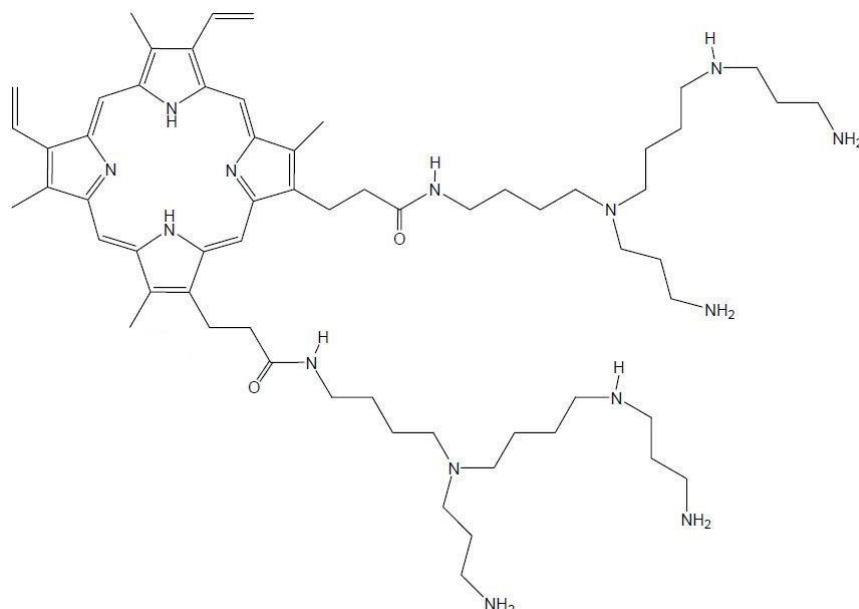


Figure I- 42- Structure de la protoporphyrine IX disperminée (PpIX-dSm).
La PpIX est vectorisée par deux molécules de spermine à l'aide de deux bras espaceurs.

II.6. Photothérapie dynamique en cancérologie prostatique

Le cancer de la prostate étant une tumeur solide localisée, il représente un bon candidat en matière de PDT. En effet, l'administration du PS par voie intraveineuse peut être envisagée, suivie d'une irradiation de la glande prostatique cancéreuse via l'utilisation d'aiguilles guidant des fibres optiques et grâce à l'utilisation d'appareillage de monitoring pour le suivi de la procédure (**Tableau 7**).

La première utilisation clinique de la PDT pour le cancer de la prostate remonte à 1990 lorsque Torgny Windahl utilise des dérivés d'hématoporphyrine, administrés par voie intraveineuse (2,5 mg/kg), pour traiter 2 patients porteurs d'un cancer de la prostate localisé, traités 6 semaines plus tôt par résection transurétrale de la prostate (83). L'activation des PS par illumination transurétrale à une longueur d'onde de 652 nm a conduit à des biopsies de contrôle à 3 mois négatives.

En 2003, les résultats d'une étude clinique de phase I incluant 6 patients porteurs d'adénocarcinome prostatique localisé sont publiés (84). La PDT est utilisée durant une prostatectomie radicale chez un patient et après résection de la prostate chez les 5 autres. Le PS utilisé est le 5-ALA (20 mg/kg) activé à l'aide d'un laser diode de 633 nm utilisé soit par voie endourétrale soit par voie périnéale. La surveillance carcinologique consistant en des dosages de PSA réguliers rapporte une décroissance du taux de PSA de 20 à 70% six semaines après la procédure.

En 2007, d'autres résultats portant sur une étude clinique de phase I incluant 6 patients porteurs d'adénocarcinome prostatique localisé sont publiés (50). Le PS utilisé est le Foscan® (0,15 mg/kg) activé à 652 nm. La surveillance carcinologique rapporte une diminution du taux de PSA, les lésions de nécrose sont visibles en IRM mais tous les patients présentent au moins une biopsie positive à 2 mois.

Plus tard, des essais cliniques de phase I/II sont menés en Europe et aux Etats-Unis sur le Tookad® afin d'évaluer la dose optimale de PS nécessaire à l'obtention d'un effet carcinologique maximal. L'observation de certains effets indésirables, notamment une hypotension, conduit à réaliser les essais de phase II avec la Padeliporphine (WST11 ou Tookad soluble®) sans effet indésirable connu.



De nombreuses publications démontrent qu'il n'existe pas une seule et unique voie de signalisation qui conduit à la mort des cellules cancéreuses suite à un traitement par PDT. En effet, les mécanismes sont divers : dommages causés directement au niveau de la cellule cancéreuse mais aussi au niveau du système vasculaire permettant le maintien de la tumeur, ou encore une activation de la réponse immune. L'ensemble de ces phénomènes mettent en jeu différents types de mort cellulaire : la nécrose, l'apoptose et l'autophagie.



Année	PS	Zone d'ablation	Nombre de patients	Voie d'abord	PSA pré-opératoire (ng/mL)	Résultats IRM	PSA post-opératoire (ng/mL)	Persistance de cancer sur les biopsies de contrôle	Effets indésirables	Ref.
1990	Photofrin®	Prostate restante après RTUP	2	Transurétrale	6 et 10	N/A	Réduction 0,2 et 2,5	0/2	Aucun	(83)
2003	5-ALA	Variable	6	Transpérinéale (N=2) Transurétrale (N=3) Pendant prostatectomie radicale (N=1)	4,9-10,6	N/A	Réduction de 10 à 70%	N/D	Aucun	(84)
2006	Foscan®	Hémi-ablation	6	Transpérinéale	1,9-15	Zone de nécrose visible	Réduction pour 8 procédures sur 10 (14-67%)	10/10	Sepsis, urgenteries, rétention	(50)
2010	Tookad® soluble	Hémi-ablation et glande entière	40	Transpérinéale	N/D	Zone de nécrose visible	N/D	N/D	Rétention	(85)
2011	Tookad® soluble	Hémi-ablation	85	Transpérinéale	N/D	87% de nécrose dans le lobe traité	N/D	N/D	Prostatite, hématurie, orchite, épidymite, neuropathie optique, sténose urétrale	(86)

Tableau 7 – Principales études cliniques concernant la PDT du cancer de la prostate



Chapitre III. La mort cellulaire programmée ou apoptose

C'est en 1972, alors que la seule forme de mort cellulaire connue était la nécrose, que J.F. Kerr désigne un nouveau mode de mort cellulaire par les termes « mort cellulaire programmée » ou « apoptose ».

La nécrose est une mort cellulaire dite "accidentelle" qui survient lors d'un dommage tissulaire et qui implique des groupes de cellules. Lors de la nécrose, la cellule gonfle, la membrane cellulaire se rompt déversant le contenu cellulaire dans le tissu environnant et provoquant localement une inflammation. Cette inflammation est provoquée par la présence d'enzymes et de substances inflammatoires présentes dans le cytosol. La nécrose donne finalement l'image d'un phénomène anarchique et désordonné à caractère explosif, tandis que l'apoptose est un processus « physiologique » de mort cellulaire, hautement régulée et qui est indispensable à la survie des organismes multicellulaires.

L'apoptose est un phénomène qui se caractérise par une morphologie particulière de la cellule en fin de vie, cela étant dû à la condensation et à la fragmentation de son matériel génétique. C'est un processus actif d'élimination physiologique des cellules en excès, endommagées, infectées, soit potentiellement dangereuses pour l'organisme.

III.1. Les rôles physiologiques de l'apoptose

Chez l'Homme, l'apoptose joue un rôle tout au long de la vie : à la fois, au cours du développement mais aussi à l'âge adulte dans la régulation de l'homéostasie tissulaire.

Au cours de l'embryogenèse, des structures initialement mises en place au cours du développement sont ensuite détruites par apoptose.

C'est notamment le cas lors de la différenciation sexuelle de l'embryon : lorsque l'embryon est génétiquement masculin (XY), l'hormone de régression müllérienne (AMH) sécrétée par les cellules de Sertoli, présentes au niveau des testicules, induit la dégénération par apoptose des canaux de Müller, et la testostérone sécrétée par les cellules de Leydig permet le maintien des canaux de Wolff. A l'inverse, lorsque l'embryon est génétiquement féminin (XX donc dépourvu de chromosome sexuel Y), l'hormone AMH n'est pas sécrétée, les canaux de Müller demeurent donc, et se développent en voies génitales femelles. La testostérone n'étant pas produite, elle ne permet alors pas le maintien des canaux de Wolff qui, eux, vont régresser.

Ce phénomène d'apoptose est retrouvé également lors de la morphogenèse des doigts où elle est à l'origine de la mort des cellules de l'espace interdigital générées au début de l'embryogenèse ; ou encore lors de la mise en place des systèmes nerveux et immunitaire où elle assure qu'un nombre correct de cellules souches se différencient. Pendant le développement embryonnaire, les neurones sont générés en excès mais seuls ceux connectés correctement à leur cible vont survivre, laissant les autres mourir par apoptose. De même, lors de développement du système immunitaire, la sélection lymphocytaire met en jeu l'apoptose afin d'éliminer les lymphocytes T et B auto-immuns.

L'apoptose intervient aussi chez l'adulte. Elle permet à l'organisme de contrôler le nombre de cellules et la taille des tissus. C'est le cas par exemple lors du renouvellement des kératinocytes de la peau ou à la fin de la réaction immunitaire, où les lymphocytes T activés en surnombre, meurent par apoptose.



L'implication de l'apoptose dans le bon fonctionnement physiologique d'un individu explique pourquoi son dérèglement (déficit ou excès) peut être à l'origine de diverses pathologies telles que des anomalies du développement, des désordres immunitaires, des maladies neurodégénératives ou encore le développement de cancers.

III.2. Les voies d'induction de l'apoptose

L'apoptose est une forme active de mort cellulaire sous contrôle génétique. Elle résulte de l'activation d'un programme préétabli d'interactions moléculaires en réponse à un stimulus. Selon la nature du signal (intra ou extracellulaire), l'apoptose est orientée selon deux voies principales d'induction : la voie des récepteurs de mort (ou voie extrinsèque) et la voie mitochondriale (ou voie intrinsèque). Quelle que soit la voie empruntée, l'apoptose peut classiquement être divisée en trois phases :

- une phase d'induction ou d'initiation qui est un phénomène réversible au cours duquel le signal apoptotique (intra ou extracellulaire) est transmis à des caspases initiatrices par des molécules adaptatrices,
- une phase d'exécution durant laquelle des caspases dites exécutoires interviennent dans l'exécution de l'apoptose,
- une phase de dégradation de la cellule.

III.2.1. Les acteurs clés de l'apoptose : les caspases

III.2.1.1. Structure des caspases

Les acteurs clés du phénomène d'apoptose sont donc les caspases. Qu'elles soient initiatrices ou inductrices, elles font partie de la famille des « Cysteinyl Aspartate-Specific Proteases ». Initialement sous forme de procaspases, ce sont des zymogènes, c'est-à-dire des précurseurs dépourvus d'activité enzymatique, mais qui, après activation, constituent des enzymes actives, les caspases.

Chez l'Homme, 14 caspases ont été identifiées : les caspases 1, 4 et 5 impliquées dans le processus inflammatoire, les caspases 2, 8, 9 et 10 dites « initiatrices » et qui sont responsables de l'induction d'une cascade d'évènements aboutissant à l'activation de 3 caspases dites effectrices, les caspases 3, 6 et 7. L'ensemble de ces caspases présente une homologie de structure (**Figure I-43**) :

- un pro-domaine amino-terminal dont la longueur varie en fonction du type de caspases : les caspases initiatrices possèdent un pro-domaine long présentant des motifs d'interaction protéine-protéine (DED « Death Effector Domain » et CARD « Caspase Activation and Recruitment Domain) alors que les caspases effectrices présentent plutôt un pro-domaine court.
- une sous-unité longue (p20 de 20 KDa) qui possède une région QACXG dans laquelle on retrouve la cystéine essentielle à l'activité de l'enzyme,
- une sous-unité courte carboxyterminale (p10 de 10 KDa).



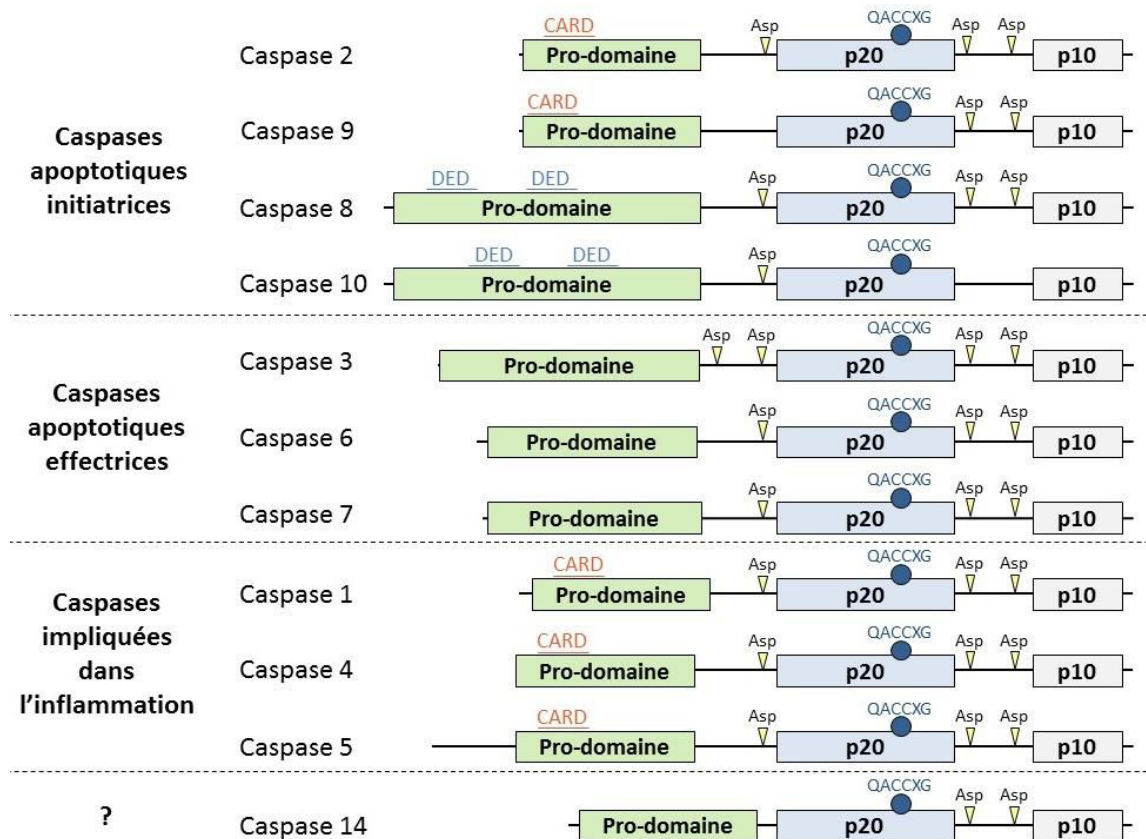


Figure I- 43- Homologie de structure des caspases chez l'Homme.

Les caspases possèdent toutes un pro-domaine N-terminal, une longue sous-unité p20 et une courte sous-unité C-terminale p10. Les caspases diffèrent selon la présence ou non de domaines CARD (Caspase Activation Recruitment Domain) et DED (Death Effector Domain) au niveau de leur pro-domaine et selon le nombre de résidus aspartate présents, résidus indispensables à leur clivage et donc à leur activation.

III.2.1.2. Activation des caspases

L'activation des caspases se fait lors de leurs recrutements au niveau de complexes protéiques (le DISC concernant la voie extrinsèque ou l'apoptosome lors de l'induction de la voie intrinsèque) mais aussi par clivage protéolytique de la forme zymogène au niveau de sites consensus comportant un résidu aspartate.

Les caspases initiatrices sont monomériques. Cependant, la simple interaction de leur pro-domaine long avec des molécules adaptatrices suffit à leur oligomérisation et leur activation. Le clivage de leur pro-domaine au niveau de résidus aspartate intervient secondairement et amplifie le signal.

Les caspases effectrices sont dimériques. Leur activation est due à leur clivage, toujours au niveau de résidus aspartate, par les caspases initiatrices. En effet, diverses protéases sont capables de cliver les caspases, néanmoins la présence du résidu aspartate fait qu'une caspase peut être reconnue par une autre caspase. Cet auto-clivage permet d'initier une cascade enzymatique permettant d'amplifier et d'intégrer les signaux pro-apoptotiques.

Le clivage des caspases permet de séparer les deux sous-unités et de couper le pro-domaine. Bien que la grande sous-unité contienne le domaine catalytique, son activité nécessite la liaison à la petite sous-unité. Les caspases activées sont ainsi composées d'un tétramère actif, p20₂p10₂, responsable de la protéolyse de la majorité des protéines intracellulaires dégradées au cours de l'apoptose (**Figure I-44**).



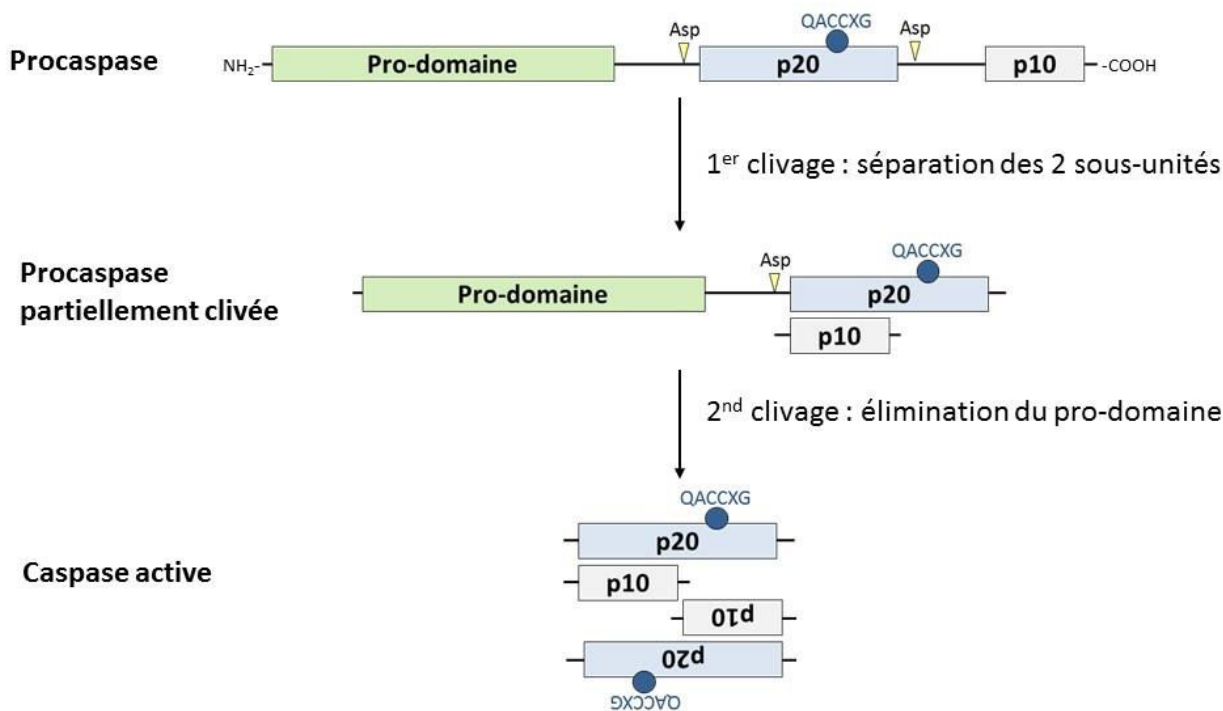


Figure I- 44- Activation des caspases.

L'activation des caspases nécessite 2 clivages au niveau de résidus aspartate. Le premier clivage permet la séparation des 2 sous-unités (p20 contenant le site catalytique QACCXG et p10) alors que le second permet l'élimination du pro-domaine. Les caspases actives sont donc formées d'un tétramères p20₂p10₂. D'après Park et al., 2012 (87).

Une multitude de protéines est aujourd'hui identifiée comme cibles des caspases :

- des protéines directement impliquées dans la régulation de l'apoptose ou des caspases elles-mêmes
- des protéines médiatrices et régulatrices de la transduction du signal apoptotique,
- des protéines de structure : les kératines ou les lamines
- des protéines de régulation de l'ADN : La Poly(ADP-ribose)-Polymérase (PARP), impliquée dans le maintien de l'intégrité génomique, n'exerce plus son effet réparateur sur l'ADN une fois clivée par les caspases
- des protéines régulatrices du cycle cellulaire
- des protéines impliquées dans certaines pathologies humaines.

III.2.1.3. La régulation des caspases

A ce jour, huit protéines IAPs (Inhibitor Apoptosis Protein) sont identifiées chez l'Homme telles que c-IAP1, c-IAP2, survivin et XIAP, ce dernier étant l'inhibiteur de caspase le plus puissant et le plus caractérisé. Cette famille se caractérise par la présence d'un motif peptidique particulier appelé BIR (Baculovirus IAP Repeats) qui peut être répété plusieurs fois et qui est nécessaire à la liaison et à l'inhibition des caspases.

Ces protéines ont la capacité d'inhiber l'apoptose induite par divers stimuli via 2 mécanismes : une liaison directe à la caspase supprimant ainsi son activité catalytique ou une activité E3 ligase induisant l'ubiquitination et la dégradation de la caspase cible via le protéasome. Les IAPs inhibent à la fois l'activité des caspases initiatrices et celle des caspases effectrices mais présentent des spécificités d'inhibition pour certaines caspases propres à chaque IAP.



Durant l'apoptose, cette activité des IAPs est finement régulée. D'une part, la protéine FLIP (Flice- Inhibitory protein) entre en compétition avec la procaspase-8 et bloque son recrutement au niveau du récepteur de mort lors de l'induction de la voie apoptotique extrinsèque. D'autre part, les IAPs peuvent être régulés par l'action inhibitrice des activateurs d'apoptose mitochondriaux Smac/Diablo ou Omi/Htra2 libérés dans le cytosol lors de l'induction de la voie apoptotique intrinsèque.

Ainsi, les deux voies d'induction de l'apoptose mettent en jeu des acteurs, certes de forte homologie, mais qui leur sont propres.

III.2.2. La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque

La voie apoptotique extrinsèque est activée par la fixation de ligands pro-apoptotiques au niveau d'une classe de récepteurs membranaires appartenant à la superfamille des TNFR (Tumor Necrosis Factor Receptor) tels que le récepteur au Fas-Ligand appelé Fas, les récepteurs au TNF (Tumor Necrosis Factor) TNFR-1 et TNFR-2 et les récepteurs au TNF related apoptosis inducing ligand (TRAIL) DR-4 et DR-5.

Ces récepteurs sont caractérisés par un domaine extracellulaire présentant un nombre variable de domaines riches en cystéine (CRD – Cysteine Rich Domains) qui favorisent la liaison du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire présentant une région conservée, le « domaine de mort » (DD – Death Domain) responsable de la transduction du signal apoptotique.

L'interaction ligand/récepteur induit la trimérisation de chacun d'eux afin d'induire l'activation du récepteur. Le domaine DD du récepteur, dépourvu d'activité enzymatique, permet le recrutement de protéines adaptatrices cytosoliques : les protéines FADD (Fas-Associated Death Domain) ou TRADD (TNF receptor associated death domain). Celles-ci possèdent un domaine DD, homologue au récepteur, qui va permettre d'assurer leur liaison au récepteur activé, et un domaine DED (Death Effector Domain) capable d'interagir avec le domaine DED situé au niveau des pro-domaines des procaspases initiateuses 8 et 10. Ces dernières, sous forme de zymogènes, sont recrutées par les protéines adaptatrices au niveau des récepteurs de mort : ce complexe ainsi formé est appelé DISC (Death Inducing Signaling Complex). Les procaspases initiateuses ainsi rapprochées, ont la capacité de s'autocliver pour s'activer. La caspase-8 activée induit l'activation de caspases effectrices responsables de la phase d'exécution de l'apoptose.

La formation du complexe DISC est l'évènement au cours duquel la voie extrinsèque est régulée. En effet, comme dit précédemment, il existe une isoforme de la caspase-8, la protéine FLIP, capable d'entrer en compétition avec cette dernière. En effet, la protéine FLIP contient 2 domaines DED mais ne possède pas de site catalytique : elle peut donc empêcher le recrutement de la procaspase-8 au niveau du DISC et n'induire aucune signalisation pro-apoptotique.

Dans la plupart des cellules, le signal provenant des récepteurs activés n'est pas assez fort pour déclencher la cascade d'activation des caspases. Dans ce cas l'activation des caspases effectrices nécessite une amplification du signal apoptotique via l'activation de la voie intrinsèque ou voie mitochondriale de l'apoptose, notamment via la protéine t-Bid (**Figure I-45**).



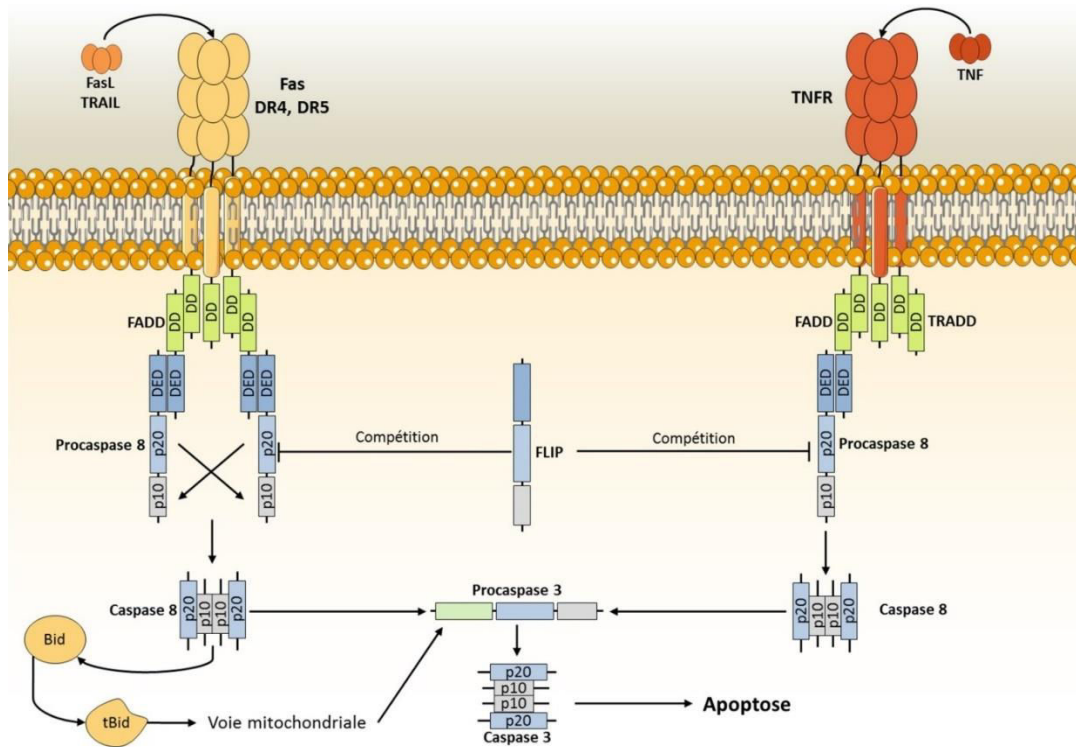


Figure I- 45- Voie apoptotique extrinsèque ou voie des récepteurs de mort.

La voie extrinsèque fait intervenir plusieurs types de récepteurs (Fas, TNFR, TRAIL) capables d'interagir avec les procaspases initiatrices 8 et 10 qui vont s'auto-activer par clivage. Une fois activées, ces caspases vont activer la caspase effectrice, la caspase 3. Cette dernière activation nécessite parfois une amplification du signal via la voie apoptotique intrinsèque, notamment grâce à la protéine t-Bid. D'après Gupta, 2003 ((88))

III.2.3. La voie apoptotique mitochondriale ou intrinsèque

La voie intrinsèque de l'apoptose regroupe les événements moléculaires issus de dommages subcellulaires subits par la cellule convergeant vers la mitochondrie. L'implication de cette dernière dans divers processus physiologiques tels que la production d'énergie, l'oxydation des lipides ou encore la génération d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) fait de celle-ci un organe central dans le phénomène de mort cellulaire programmée.

III.2.3.1. La mitochondrie, acteur clé de la voie apoptotique intrinsèque

La mitochondrie est composée de deux membranes, une membrane mitochondriale externe et une membrane mitochondriale interne, qui délimitent trois milieux : le milieu extra-mitochondrial (cytoplasme de la cellule), l'espace intermembranaire mitochondrial, et la matrice mitochondriale.

C'est au sein de la mitochondrie qu'ont lieu les dernières étapes du cycle respiratoire qui permettent la conversion de l'énergie des molécules organiques issues de la digestion, telles que le glucose, en énergie directement utilisable par la cellule, l'ATP (Adénosine TriPhosphate).

Le fonctionnement de la chaîne respiratoire au niveau de la membrane interne de la mitochondrie génère un gradient de protons entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire et crée ainsi un potentiel membranaire mitochondrial (ψ_m). Le retour des protons dans la matrice ne peut se produire qu'au niveau de passages spécifiques constitués par l'ATP synthase. L'ATP formé est alors transporté par l'adénine nucléotide translocase (ANT) dans l'espace intermembranaire en échange d'une molécule d'ADP. L'ATP passe ensuite dans le cytosol au travers de canaux anioniques voltage-dépendants, les VDAC (**Figure I-46**).



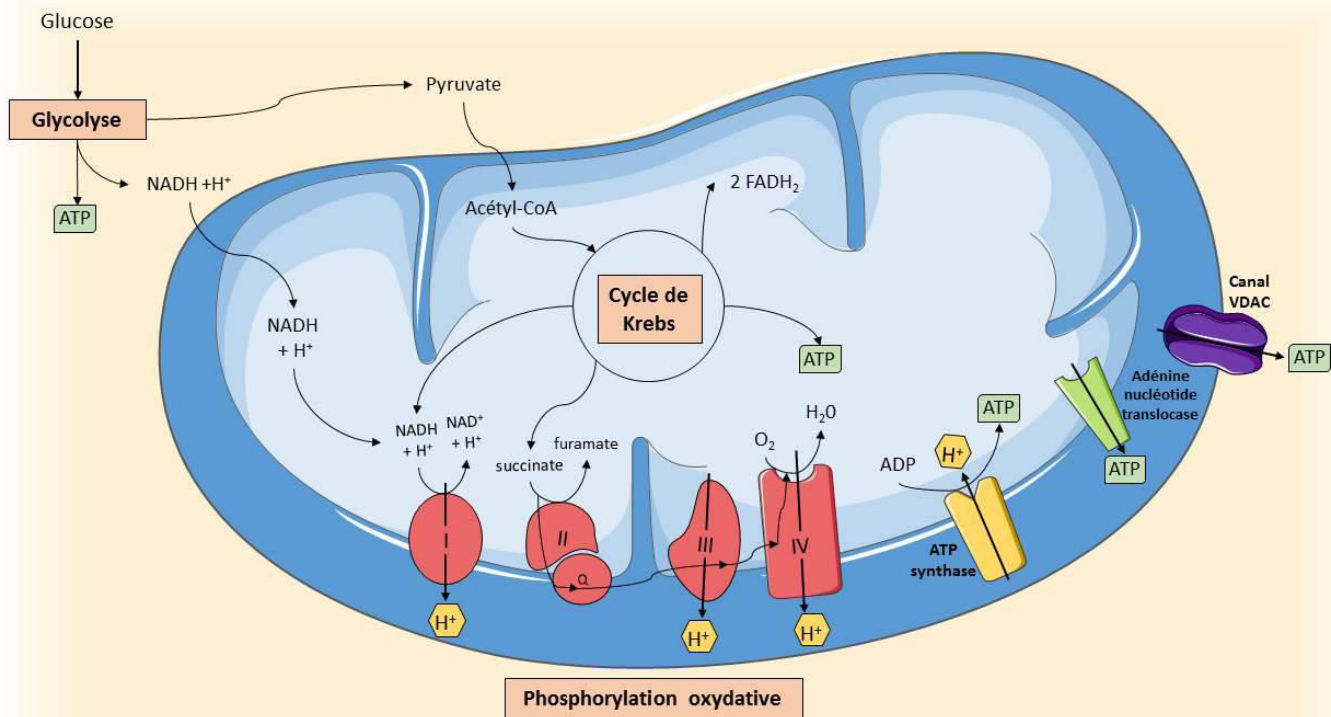


Figure I- 46- La mitochondrie, organite producteur d'énergie.

La production d'ATP se déroule en 3 étapes : la glycolyse qui a lieu dans le cytoplasme, le cycle de Krebs dans la matrice mitochondriale et la phosphorylation oxydative via la chaîne de transport des électrons qui est présente au niveau de la membrane interne mitochondriale. L'ATP formé au sein de la matrice mitochondriale est relarguée dans l'espace intermembranaire mitochondrial via l'adénine nucléotide translocase (ANT) et rejoint le cytoplasme de la cellule à l'aide de canaux anioniques voltage-dépendants (VDAC).

Outre son rôle physiologique, la mitochondrie se présente comme l'acteur clé de la voie apoptotique intrinsèque. En plus de sa perte de fonction qui priverait la cellule d'énergie, la mitochondrie est impliquée dans l'intégration et à la propagation des signaux de mort activés par des facteurs endogènes. En effet, les événements essentiels mitochondriaux qui vont précipiter la cellule vers la mort apoptotique sont la perméabilisation de la membrane externe et la libération dans le cytoplasme de molécules solubles séquestrées dans l'espace intermembranaire. Ces deux phénomènes sont initiés et contrôlés par les protéines Bcl-2.

III.2.3.2. Les protéines de la famille Bcl-2

Les protéines de la famille Bcl-2 (une vingtaine chez l'Homme) présentent toutes au minimum un domaine BH (Bcl-2 Homology – BH1 à BH4). Elles sont divisées en 3 groupes (89) :

- Les protéines de survie ou anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w, Mcl-1 et A1/Bfl1) : elles contiennent 3 à 4 domaines BH. Le domaine BH4 étant une région carboxy-terminale hydrophobe, il permet l'ancrage de ces protéines à la membrane d'organites intracellulaires tels que la mitochondrie, le réticulum endoplasmique ou le noyau.
- Les protéines proapoptotiques (Bax, Bak et Bok) : elles contiennent 2 à 3 domaines BH.
- Les protéines à BH3 isolé (Bad, Bid, Bik, Bim, Hrk, Noxa, Puma...) : comme leur nom l'indique, elles ne possèdent qu'un seul domaine BH et sont inhibitrices de l'apoptose.



III.2.3.3. Perméabilisation des membranes mitochondriales

L'induction de l'apoptose via les protéines Bcl-2 débute par l'activation des protéines à domaine BH3 isolé (89). Dans des conditions normales, les protéines à BH3 isolé, situées au niveau du cytoplasme, sont très faiblement exprimées voire inactives. Selon le stimulus apoptotique, une protéine à BH3 isolé est activée soit par modification post-traductionnelle (Bad, Bid, Bim, Bmf) soit par induction transcriptionnelle (Noxa, Puma, Hrk), et est transloquée au niveau de la mitochondrie afin de neutraliser les protéines anti-apoptotiques ou d'activer les protéines pro-apoptotiques.

Les protéines pro-apoptotiques sont retrouvées sous forme monomérique : Bax située au niveau du cytoplasme, est stable et soluble et interagit avec des molécules anti-apoptotiques (Bcl-2 ou Bcl-X_L) et Bak, située au niveau de la membrane mitochondriale externe est également séquestrée par des protéines anti-apoptotiques (Bcl-X_L et Mcl-1).

L'activation de Bax, notamment par tBid qui possède une action directe sur Bax, induit son insertion au niveau de la membrane mitochondriale externe et celle de Bak est rendue possible grâce à la neutralisation de Bcl-X_L par Noxa et de Mcl-1 par Bad. Ainsi activées, les protéines Bax et Bak s'oligomérisent et forment des pores MAC (Mitochondrial Apoptosis-induced Channel) au niveau de la membrane mitochondriale externe permettant ainsi la libération de protéines de l'espace intermembranaire, les SIMPs (Soluble Inter Membrane Mitochondrial Proteins) (90).

Cette perméabilisation de la membrane mitochondriale externe peut également être due à un dysfonctionnement de l'ATP synthase mais également à l'ouverture du pore de perméabilité temporaire (PTP – Permeability Transition Pore) qui est sensible à l'augmentation de calcium et/ou des espèces réactives de l'oxygène (ROS – Reactive Oxygen Species) dans le cytosol (91). Ce PTP est composé de l'adénine nucléotide translocase (ANT) présente au niveau de la membrane mitochondriale interne, des canaux VDAC présents au niveau de la membrane mitochondriale externe et de la cyclophiline D, élément régulateur dont le ligand (la cyclosporine A - CsA), désensibilise l'ouverture du pore au calcium. L'ouverture prolongée de PTP induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale (ψ_m) suivie de la libération massive du calcium stocké dans la matrice mitochondriale et du gonflement de la mitochondrie dû à une concentration élevée de protéines dans la matrice. Finalement, les membranes mitochondriales se retrouvent perméabilisées permettant ainsi la libération, dans le cytosol, de SIMPs ainsi que le recrutement de protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2.

Il est probable que les deux mécanismes (MAC Bax/Bak dépendant et PTP) coopèrent de façon simultanée ou séquentielle pour générer la perméabilisation de la mitochondrie et la libération des SIMPs (**Figure I-47**).



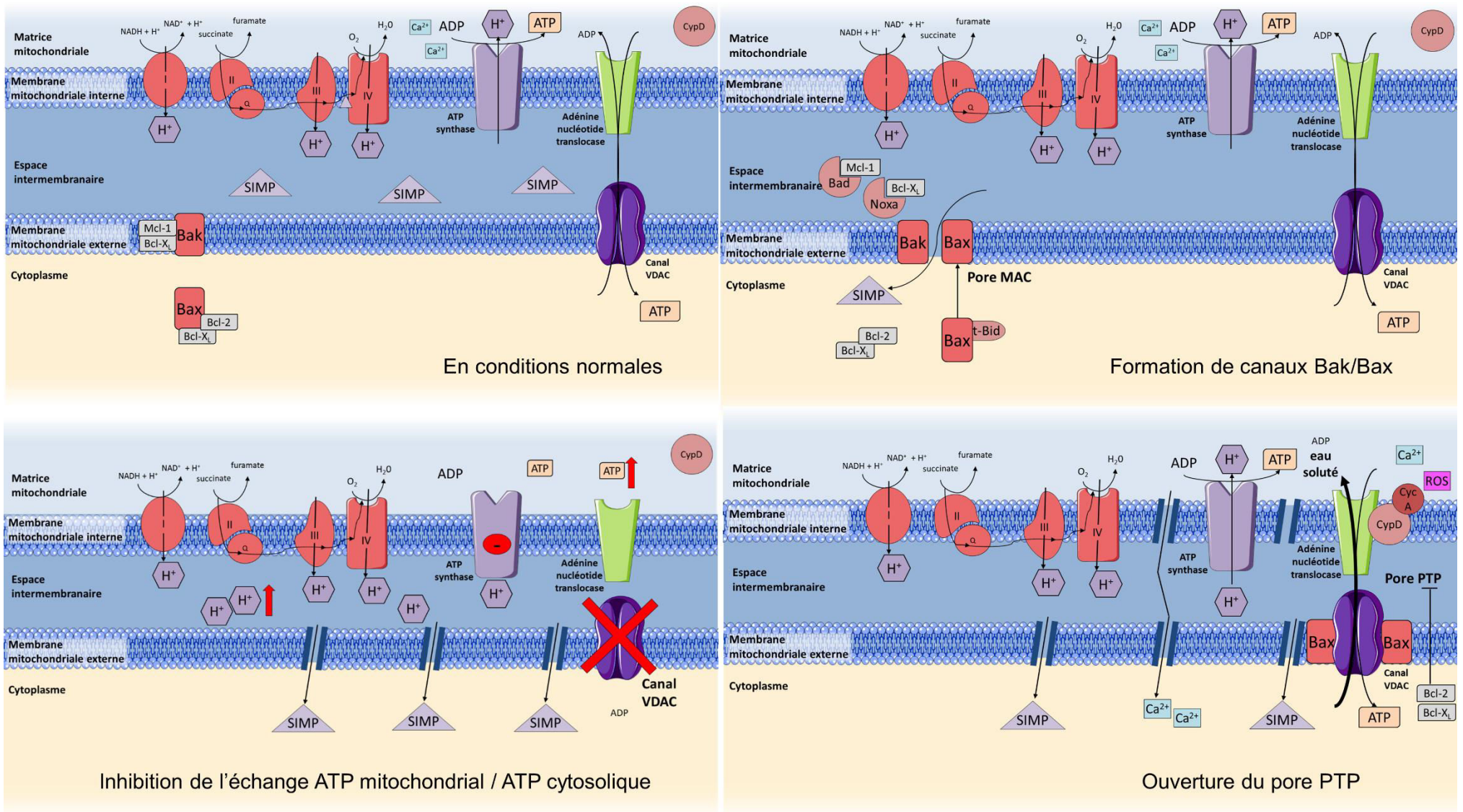


Figure I- 47- Origine de la perturbation des membranes mitochondriales au cours de l'apoptose.

En conditions normales, les protéines à BH3 isolé, situées au niveau du cytoplasme, sont très faiblement exprimées voire inactives. Selon le stimulus apoptotique, une protéine à BH3 isolé est activée et transloquée au niveau de la mitochondrie afin de neutralisation les protéines anti-apoptotiques ou d'activer les protéines pro-apoptotiques. La déstabilisation du potentiel membranaire mitochondrial peut être induite par la formation du pore MAC par Bak/Bax, l'inhibition de l'échange ADP cytosolique/ATP mitochondrial et l'ouverture du pore de perméabilité temporaire.



Cette déstabilisation du potentiel membranaire mitochondrial peut également être induite par l'inhibition de l'échange ADP cytosolique/ATP mitochondrial effectué normalement par les canaux VDAC et par le transporteur de nucléotide adénylique ou ANT. La fermeture du VDAC au cours de l'apoptose pourrait induire une absence d'échange ATP/ADP ce qui semble inhiber l'activité de l'ATP synthase et empêche le retour des protons vers la matrice et par conséquent contribue à l'hyperpolarisation. Une telle augmentation du potentiel membranaire mitochondrial peut être à l'origine du gonflement osmotique de la matrice conduisant à la rupture de la membrane externe mitochondriale, permettant également la libération des SIMPs dans le cytoplasme (92).

La famille des protéines SIMPs, libérées suite à la perméabilisation de la mitochondrie, regroupe le cytochrome c qui est un des constituants de la chaîne respiratoire, certaines procaspases (-2, -3 et -9), les protéines Smac/Diablo et Omi/HtrA2. Toutes ces protéines participent et régulent la voie mitochondriale dépendante des caspases. Deux autres SIMPs, les protéines AIF (Apoptosis-Inducing Factor) et endonucléase G sont quant à elles capables d'induire l'apoptose de façon indépendante de l'activation des caspases.

III.2.3.4. La voie apoptotique dépendante des caspases

Le cytochrome c est une hémoprotéine liée à la cardiolipine (CL) qui intervient au sein de la chaîne respiratoire (entre les complexes III et IV). Lors de l'apoptose, la peroxydation de la cardiolipine entraîne le détachement du cytochrome c. Une fois libéré dans le cytoplasme, ce dernier interagit, en présence d'ATP, avec Apaf-1 (Apoptosis Protease-Activating Factor-1), modifiant ainsi sa conformation et favorisant l'oligomérisation de 7 molécules d'Apaf-1. Ces dernières contenant un domaine CARD se lient aux domaines CARD de procaspases-9. Ces dernières se retrouvent donc suffisamment proches pour s'autocliner donc s'auto-activer. Le complexe protéique alors formé, soit un heptamère de cytochrome c/ATP/Apaf-1/caspase 9 active, est dénommé apoptosome. L'apoptosome actif est alors capable de recruter et d'activer les caspases effectrices -3 et -7. Cependant, par l'intermédiaire de leurs domaines BIR (Baculovirus IAP repeat), ces caspases effectrices interagissent avec des IAP qui bloquent leur maturation protéolytique.

Durant l'apoptose, d'autres SIMPs sont libérées de la mitochondrie : Smac/DIABLO (Second Mitochondria-Derived Activator of Caspases/Direct IAP-Binding Low pI) et la sérine protéase Omi/Htra2. Il s'agit d'antagonistes d'IAP qui vont se lier aux domaines BIR des IAP et inhiber leur activité anti-apoptotique (**Figure I-45**).

III.2.3.5. La voie apoptotique indépendante des caspases

Comme cité précédemment, l'AIF et l'endonucléase G sont deux SIMPs libérées de la mitochondrie au cours de l'apoptose. Elles sont impliquées dans la voie apoptotique indépendante des caspases.

Dans l'espace intermembranaire mitochondrial, l'AIF est retrouvée sous forme clivée et possède probablement une activité NADH oxydase (93). L'endonucléase G est également localisée au sein de l'espace intermembranaire mitochondrial.

Après activation de la voie intrinsèque, l'AIF et l'endonucléase G se transloquent de l'espace intermembranaire vers le cytoplasme puis vers le noyau.

Au sein du noyau, l'AIF induit une condensation périphérique de la chromatine ainsi qu'un clivage de l'ADN en fragments d'environ 50 kb, ceci par interaction directe avec l'ADN sans spécificité



de séquence. L'endonucléase G, elle, digère l'ADN en absence d'activité caspase et en absence de la nucléase caspase-dépendante. Elle pourrait agir avec l'exonucléase et la DNase I dans le noyau pour générer les fragments d'ADN de haut poids moléculaire mais également des fragments oligonucléosomiques. Cette coopération entre l'AIF et l'endonucléase G permet ainsi une apoptose indépendante des caspases (**Figure I-48**).

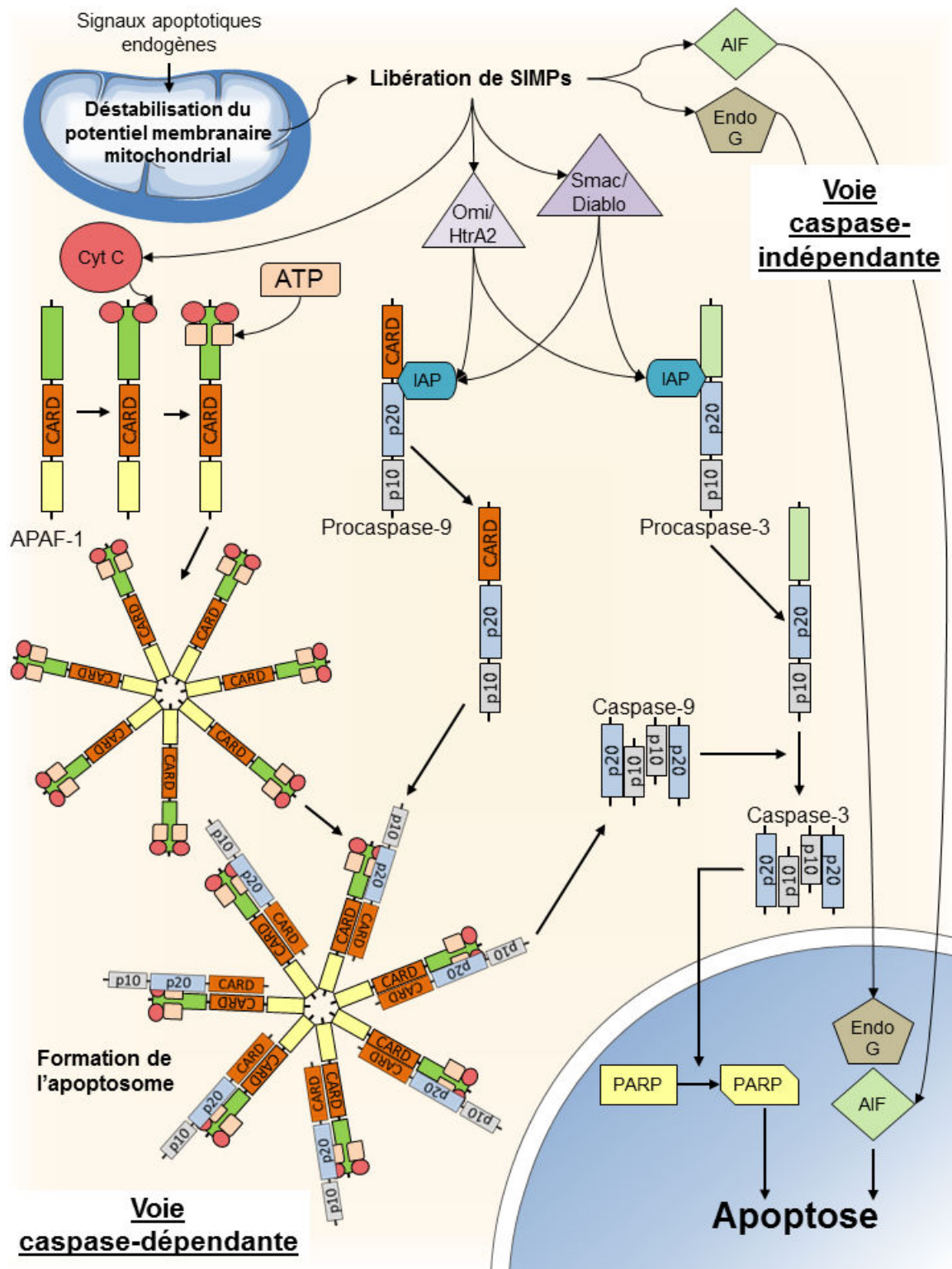


Figure I- 48- Voie apoptotique intrinsèque ou voie mitochondriale.

Après déstabilisation du potentiel membranaire mitochondrial, les protéines SIMPs libérées au sein du cytoplasme vont pouvoir induire les deux voies caractéristiques de la voie apoptotique intrinsèque. La voie apoptotique caspase-dépendante met en jeu la formation de l'apoptosome, l'activation des caspases initiatrices et effectrices à l'origine du processus apoptotique. La voie apoptotique caspase-indépendante est initiée par la libération de l'AIF et de d'endonucléases G suivie de leur translocation dans le noyau à l'origine de la fragmentation de l'ADN.



Ainsi, l'exécution du phénomène apoptotique est dépendant de la nature du signal (intra ou extracellulaire). En fonction, l'apoptose est orientée selon deux voies principales d'induction : la voie des récepteurs de mort (ou voie extrinsèque) caspases-dépendante et la voie mitochondriale (ou voie intrinsèque) qui peut être soit caspases-dépendante soit caspases-indépendante. Enfin, d'autres voies moléculaires affectent ce processus. C'est notamment le cas de la voie des MAPKs, de la voie PI3K/Akt et du facteur de transcription NF-κB.

III.3. Mort cellulaire programmée et photothérapie dynamique anticancéreuse

La dérégulation de l'apoptose peut perturber l'équilibre délicat entre la prolifération cellulaire et la mort cellulaire conduisant ainsi à des maladies telles que le cancer. L'évasion au phénomène apoptotique a été reconnue comme l'une des modifications essentielles dans la physiologie des cellules en croissance maligne et est une caractéristique de la plupart des cancers, voire de tous les types de cancer. Cette évasion conduirait ainsi la croissance incontrôlée de la tumeur et à son incapacité à répondre au stress cellulaire, à des mutations nuisibles ou encore à des lésions de l'ADN. En outre, les cancers possédant des altérations protéiques impliquées dans la signalisation de la mort cellulaire sont souvent résistants à la chimiothérapie et sont plus difficiles à traiter à l'aide d'agents chimiothérapeutiques dont l'action est principalement l'induction de l'apoptose.

L'apoptose induite par la PDT a fait l'objet de nombreuses publications. Etant donné le faible rayon d'action de l'oxygène singulet, il est admis que l'apoptose est essentiellement initiée à partir des dommages oxydants induits par la PDT au niveau des sites de localisation des PS (la mitochondrie, le réticulum endoplasmique ou les lysosomes étant, en ordre décroissant, les plus susceptibles à ce processus). La voie apoptotique intrinsèque mettant en jeu la mitochondrie est donc la voie prédominante induite par la PDT.

Plusieurs recherches ont été menées afin de mettre en évidence le processus conduisant à la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et le rôle du pore de perméabilité temporaire (PTP) dans le cadre de la PDT. Deux causes hypothétiques ont été soumises : la forte sensibilité à la photo-oxydation des composants du PTP et l'affinité de certains PS pour certaines protéines de la membrane mitochondriale pouvant jouer un rôle dans la régulation de la perméabilité temporaire. En effet, la haute affinité de la PpIX pour les récepteurs périphériques des benzodiazépines (PBR) alors connue, leur photo-oxydation est apparue comme une des causes possibles de l'ouverture du PTP dans les cellules leucémiques humaines Reh traitées par l'héxaminolévulinate. L'utilisation de l'acide bongkreique (AB), un agent bloquant l'unité ANT du PTP, supprime l'effet dépolarisant induit par la PpIX (94). De plus, l'utilisation d'autres inhibiteurs du PTP tels que la cyclosporine A (CsA) et la trifluoroperazine (TPZ), restaure le potentiel membranaire mitochondrial des cellules de carcinome épidermoïde humain traitées par la phtalocyanine 4 (Pc 4) (95). Ainsi, l'implication du PTP dans l'apoptose induite dans le cadre de la PDT a été démontrée pour les PS d'affinité mitochondriale, contrairement à ceux préférentiellement localisés dans les autres organites de la cellule. En effet, l'utilisation de la CsA ne permet pas de restaurer le potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules traitées par l'hypéricine préférentiellement localisée au sein du réticulum endoplasmique et des lysosomes (96), tout comme c'est le cas de la CsA et de la TPZ dans les cellules traitées par le Foscan® localisé préférentiellement au niveau du réticulum endoplasmique et de l'appareil de Golgi et moins fréquemment, au niveau de la mitochondrie (97).

Cette dépolarisation de la membrane mitochondriale peut être déclenchée par l'activation des acteurs apoptotiques de la famille Bcl-2 tels que Bax, une protéine pro-apoptotique, et Bcl-2, une protéine anti-apoptotique.

Dans les cellules de cancer du sein MCF-7c3, la photoactivation de la Pc 4 induit une translocation de Bax du cytosol vers la mitochondrie et un relargage du cytochrome c de la



mitochondrie vers le cytosol. Une inhibition de l'expression de Bax dans ces cellules induit une inhibition de 50% de l'apoptose induite par la Pc 4. Bax apparaît donc nécessaire dans l'induction du processus apoptotique. A l'inverse, les cellules cancéreuses DU 145, déficientes pour Bax, ne présentent aucun signe d'apoptose suite à la photoactivation de Pc 4. La restauration de l'expression de Bax permet d'induire l'apoptose au sein de cette lignée, suggérant que cette résistance des cellules DU 145 vis-à-vis de la Pc 4 est due à cette déficience en Bax. (98).

Le contrôle étroit de l'activation de Bax par la protéine anti-apoptotique Bcl-2 laisse supposer que le ratio d'expression des deux protéines Bax/Bcl-2 est un élément clé de l'entrée des cellules en apoptose. Une perte d'expression de la protéine Bcl-2 et une augmentation d'expression de la protéine Bax est retrouvée suite à l'utilisation de plusieurs PS dans divers types de cellules cancéreuses.

En effet, *in vitro*, le 5-ALA induit l'inhibition du niveau d'ARNm Bcl-2 et l'augmentation du niveau d'ARNm de Bax dans les lignées cancéreuses du col de l'utérus (99) et œsophagiennes (100). Ces mêmes variations sont retrouvées chez des souris BALB/c nudes, porteuses de tumeurs utérines (101). Il en est de même avec l'hypéricine qui induit une inhibition de l'expression de Bcl-2 et Bcl-X_L (102) et une augmentation d'expression de Bax dans des lignées de cancer du sein (103). En revanche, l'hypéricine n'a aucun effet sur Bcl-2 chez la lignée cancéreuse colorectale humaine HCT-116 (104).

Plusieurs PS sont à l'origine de nombreux photo-dommages au niveau des protéines Bcl-2 et Bcl-x_L mais n'ont aucun effet sur les protéines pro-apoptotiques Bax et Bak malgré leur similitude de structure avec Bcl-2/X_L. Ce constat va dans le sens selon lequel la proximité de la protéine cible avec le PS est un facteur essentiel de la photo-dégradation. L'expression et la fonctionnalité de Bax demeurant intacte, le ratio Bax/Bcl-2 serait par conséquent favorable à l'apoptose induite par la PDT. C'est notamment le cas de la Pc 4 qui induit une inhibition de l'expression de Bcl-2 endogène, inhibition également retrouvée suite à une surexpression de Bcl-2 induite dans plusieurs lignées dont les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145 et LNCaP (105).

A l'inverse, les cellules cancéreuses colorectales humaines HT-29 résistantes à la PDT montrent une augmentation de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 et une diminution du niveau d'expression de la protéine pro-apoptotique Bax (106).

L'ensemble des phénomènes clés de la voie apoptotique intrinsèque a été mis en évidence dans de nombreuses lignées traitées par un large éventail de PS (107).

En effet, l'activation de la caspase-9 et de la caspase-3, le clivage de la protéine PARP et une fragmentation de l'ADN ont été mis en évidence en cas de traitement des cellules leucémiques humaines HL60 par la PpIX via l'utilisation du 5-ALA (108). Aussi, la photoactivation de la MPPa, un dérivé de la chlorophylle a, induit une activation de la caspase-9 et de la caspase-3 mais n'a aucun effet sur l'activation de la caspase-8 dans la lignée cancéreuse prostatique PC-3M (109). L'utilisation de 5-ALA sur la lignée PC-3 entraîne l'activation de la caspase-3 (110). Enfin, dans cette même lignée, le Photofrin® induit également la voie apoptotique intrinsèque (111).

Ainsi, la majorité des PS actuellement utilisés induisent, une fois activés par une lumière de longueur d'onde appropriée, le phénomène apoptotique majoritairement via sa voie intrinsèque.

Dans le cadre de la PDT, le processus apoptotique est soumis à de nombreuses régulations via une grande diversité de voies de signalisation cellulaire. Il arrive qu'un mécanisme de résistance à cette mort cellulaire programmée se mette en place, ce qui est la majeure cause d'échec des thérapies anticancéreuses alors développées. C'est pourquoi il demeure important d'étudier l'effet de nouveaux PS sur les acteurs clés de cette transduction du signal.



Chapitre IV. La transduction du signal

La prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire ou encore l'apoptose sont régulées par divers phénomènes activés ou inhibés par différents stimuli externes ou internes. Ces stimuli activent des voies de transduction du signal qui permettent à leur tour d'activer des cibles cellulaires. Les principales voies de transduction du signal sont la voie des MAP kinases (mitogen-activated protein kinase, MAPK), la voie PI3 kinase (phosphatidyl inositol-3 kinase)/Akt (PI3K/Akt) et la voie d'activation du facteur de transcription NFκB (Nuclear Factor kappa B). L'activation de ces voies se fait en général par des cascades de phosphorylation de protéines kinases qui se déroulent jusqu'à l'activation de la cible cellulaire finale. Ces cascades de phosphorylation sont régulées par des phosphatases qui en déphosphorylant les protéines kinases peuvent inhiber leur activité et interrompre la transduction du message.

IV.1. La voie des MAPKS

La voie des MAPKs peut être activée par une grande variété de stimuli externes ou internes mais le schéma classique d'activation de cette voie fait intervenir la fixation d'un ligand (mitogènes, hormones, neurotransmetteurs) à son récepteur membranaire (les récepteurs tyrosine kinase – RTK). Cette fixation induit une modification de la conformation du récepteur à l'origine de la phosphorylation du récepteur lui-même ou de protéines qui lui sont associées. Ceci conduit généralement à l'activation directe ou indirecte de protéines de la famille des protéines G, qui sont couplées au récepteur ou bien sous forme libre comme la protéine Ras.

La transduction de ce signal exogène se fait par phosphorylation séquentielle au niveau de résidus thréonine (Thr) ou tyrosine (Tyr) situés sur des motifs Thr-X-Tyr et placés dans un domaine appelé boucle d'activation (activation loop). Elle est généralement organisée sur 3 niveaux : une MAPK kinase kinase (MAP3K) qui phosphoryle et active une MAPK kinase (MAP2K ou MKK), qui à son tour, active la MAPK. Cette organisation en cascade permet une amplification du signal, mais fournit aussi de façon importante, des cibles supplémentaires de régulation de la cascade.

Les MAPKs se divisent en trois sous-familles nommées ERK (extracellular signal regulated kinase), JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) et p38 (**Figure I-49**).

IV.1.1. La voie de ERK

La voie de ERK est généralement activée par des facteurs de croissance responsables de l'activation du proto-oncogène Ras, lui-même responsable de l'activation de la MAPKKK, la protéine Raf. A son tour, cette dernière est capable d'activer les MAPKK soit les kinases MEK1 et MEK2 à l'origine de la phosphorylation et donc de l'activation des protéines ERK.

Les isoformes ERK1 et ERK2 sont les acteurs clés de la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Ils sont généralement phosphorylés au niveau de résidus tyrosine ou thréonine, et sont exprimés dans quasiment tous les tissus. Ces isoformes de ERK phosphorylent de nombreux substrats favorisant ainsi la croissance cellulaire par une progression des cellules de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. Les isoformes ERK3 et ERK4 sont considérées comme atypiques puisqu'il manque un résidu tyrosine sur leur boucle d'activation. En effet, c'est le motif Ser-Glu-Gly qui permet à ERK3 de jouer un rôle dans la prolifération, la différenciation cellulaire et la progression du cycle cellulaire, alors que les fonctions de ERK4 restent encore peu connues. ERK 5, également connue comme BMK, est activée par divers stimuli tels qu'un stress oxydatif ou des facteurs de croissance et est essentielle dans le développement normal du système vasculaire et dans la survie cellulaire.



IV.1.2. La voie de JNK

La voie de JNK est généralement activée par des cytokines, certains ligands pour les récepteurs couplés aux protéines G, en réponse à différents agents chimio-thérapeutiques ou à un stress cellulaire tel des radiations ionisantes ou un stress oxydatif. Ceci conduit à l'activation de très nombreuses MAP3K dont l'action converge vers l'activation d'uniquement 2 MAPKK, MKK4 (SEK1, MEK4, JNKK1, SKK1) et MKK7 (MEK7, JNKK2, SKK4), qui vont activer les différents isoformes de JNK par phosphorylation de leurs résidus tyrosine et thréonine.

Les protéines JNK sont codées par 3 gènes : JNK1, JNK2 ubiquitaires et JNK3 exprimé uniquement au niveau des testicules et du cerveau qui conduisent à la production d'au moins dix isoformes. Les isoformes de JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase) identifiées sont JNK1/SAPK γ , JNK2/SAPK α , et JNK3/SAPK β . Elles jouent un rôle important dans le phénomène d'apoptose, la prolifération cellulaire et la transduction du signal. En effet, plusieurs interactions entre la voie de JNK et la voie p38 ont été démontrées : notamment, JNK peut stimuler la voie p38/MAPK et plusieurs MAPKKK sont communes à ces deux voies.

IV.1.3. La voie de p38

La voie de p38 est fortement activée en réponse à un stress cellulaire à l'origine de l'activation de MAPKKK telles que MEKK4, TAK1 et ASK1 responsables de l'activation de MAPKK impliquées dans la voie de p38 mais également dans la voie de JNK. Concernant la voie de p38, les 2 MAPKK concernées, MKK3 et MKK6, effectuent une double phosphorylation des différentes isoformes de p38 au niveau de motifs Thr-Gly-Tyr. MKK3 paraît favoriser la phosphorylation de p38 α et les isoformes de p38 β , alors que MKK6 phosphoryle efficacement tous les membres de la famille p38.

Il existe quatre isoformes de p38 : p38 α , p38 β , p38 γ et p38 δ connues également comme SAPK2a, 2b, 3 et 4 qui diffèrent par leur distribution au sein des tissus. La voie p38 joue un rôle dans la survie cellulaire ou la mort cellulaire selon le type de stimuli mais également selon le type cellulaire.



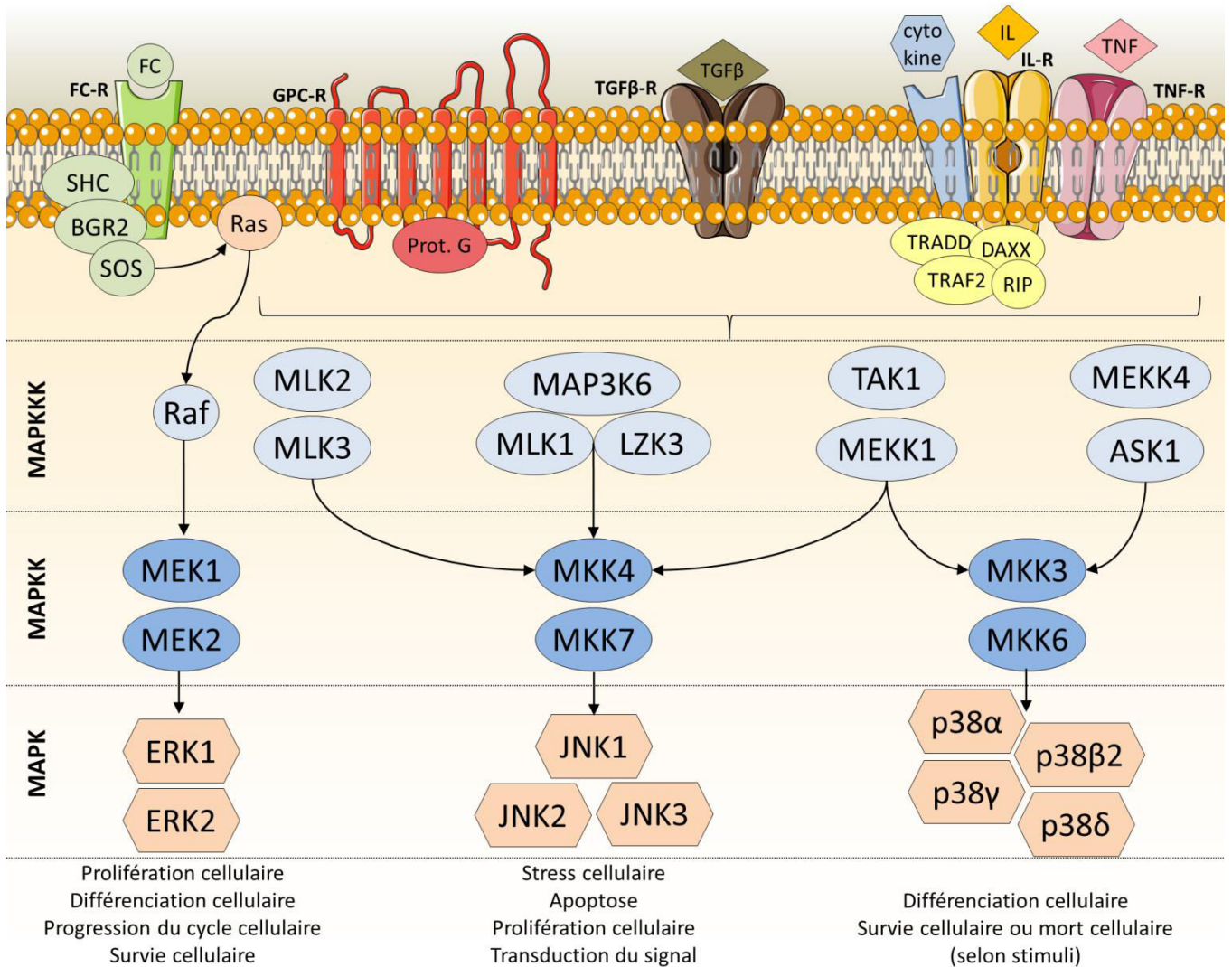


Figure I- 49– Cascades d'activation des MAPKs.

Les MAPKs se divisent en trois sous-familles nommées ERK (extracellular signal regulated kinase), JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) et p38. La voie des MAPKs peut être activée par une grande variété de stimuli externes ou internes : la fixation d'un ligand (mitogènes, hormones, neurotransmetteurs) à son récepteur membranaire (les récepteurs tyrosine kinase – RTK) induit une modification de la conformation du récepteur à l'origine de la phosphorylation du récepteur lui-même ou de protéines qui lui sont associées. Ceci conduit généralement à l'activation directe ou indirecte de protéines de la famille des protéines G, qui sont couplées au récepteur ou bien sous forme libre comme la protéine Ras. La transduction de ce signal exogène est généralement organisée sur 3 niveaux de phosphorylation : une MAPK kinase kinase (MAP3K) qui phosphoryle et active une MAPK kinase (MAP2K), qui à son tour, active la MAPK. Cette organisation en cascade permet une amplification du signal, mais fournit aussi de façon importante, des cibles supplémentaires de régulation de la cascade.



IV.1.4. La voie PI3K/Akt

L'activation de PI3K peut se faire via la liaison d'un facteur de croissance à un récepteur à activité tyrosine kinase (RTK), mais aussi via la signalisation de Ras ou encore celle des récepteurs couplés aux protéines G. Une fois activée, PI3K va phosphoryler son substrat, le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) pour produire du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3). Cette voie est négativement régulée par PTEN (protein tyrosine phosphatase and tensin homolog) qui est capable de déphosphoryler PIP3 en PIP2.

PIP3 est capable de se lier aux domaines d'homologie avec la plekstrine (PH) présents sur les différentes isoformes de la protéine kinase Akt (Akt1, Akt2 et Akt3) et sur la protéine kinase PDK1 (3'-phosphoinositide-dependent kinase 1). Sa liaison à Akt induit un changement conformationnel de cette dernière à l'origine du démasquage de deux sites de phosphorylation (Thr308 et Ser473) qui vont pouvoir être phosphorylés par la PDK1 recrutée.

Une fois activée la protéine Akt phosphoryle divers substrats qui sont impliqués dans la régulation de la prolifération, la survie et le métabolisme cellulaire mais également la migration cellulaire et l'angiogenèse (**Figure I-50**).

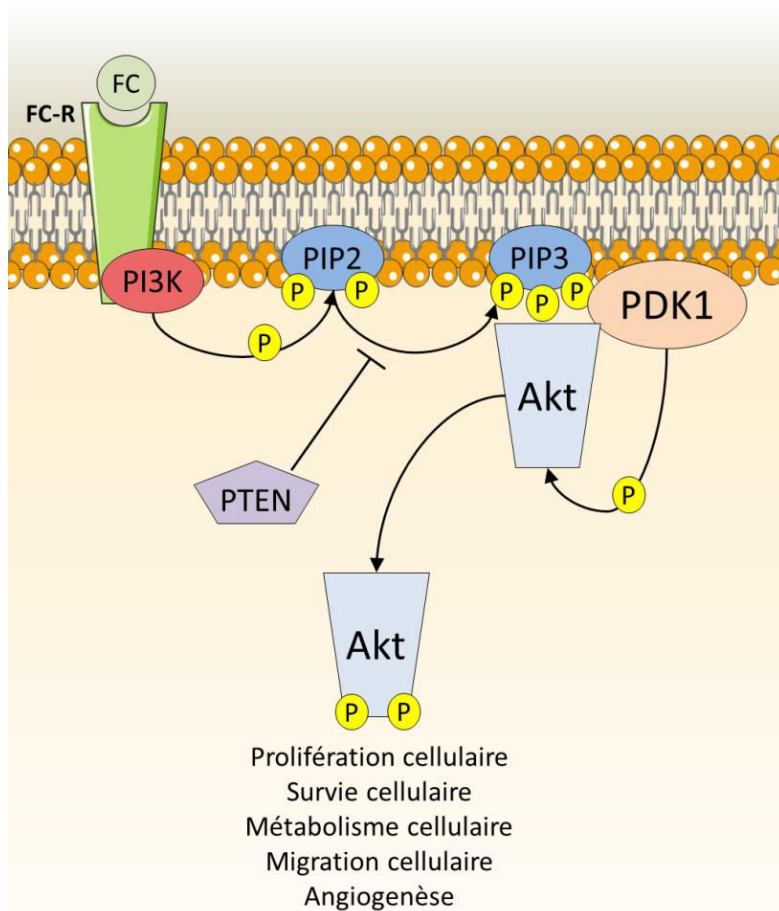


Figure I- 50– Activation de la voie PI3K/Akt

L'activation de la voie PI3K/Akt est généralement initiée par la liaison d'un facteur de croissance (FC) à son récepteur (FC-R). Une fois activée, PI3K va phosphoryler son substrat, le phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2) pour produire du phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate (PIP3). Cette voie est négativement régulée par PTEN (protein tyrosine phosphatase and tensin homolog) qui est capable de déphosphoryler PIP3 en PIP2. PIP3 est capable de se lier aux différentes isoformes de la protéine kinase Akt (Akt1, Akt2 et Akt3) et sur la protéine kinase PDK1 (3'-phosphoinositide-dependent kinase 1). Sa liaison à Akt induit un changement conformationnel de cette dernière à l'origine du démasquage de deux sites de phosphorylation (Thr308 et Ser473) qui vont pouvoir être phosphorylés par la PDK1 recrutée. Une fois activée la protéine Akt phosphoryle divers substrats qui sont impliqués dans la régulation de la prolifération, la survie et le métabolisme cellulaire mais également la migration cellulaire et l'angiogenèse.



IV.2. La voie de NF- κ B

La voie de NF- κ B est généralement activée par des cytokines telles que TNF- α et l'interleukine 1 (IL-1) ou des facteurs de croissance se liant aux récepteurs TNF, liaison à l'origine de l'activation de la kinase NIK (NF- κ B-inducing kinase) qui elle-même va activer le complexe I κ B kinase (IKK). Ce complexe, formé de deux sous-unités catalytiques IKK α et IKK β et d'une protéine régulatrice IKK γ (NEMO), peut également être activé par des MAP3K telles que MEKK1, MEKK3 ou TAK1 impliquées dans les cascades des voies de JNK et ERK, mais également par Akt. Cette activation de IKK induit la phosphorylation de sérines de I κ B suivie de la fixation d'un complexe à activité ubiquitine ligase responsable de la polyubiquitination de I κ B et de son adressage vers le protéasome 26S où il sera dégradé. Ainsi, NF- κ B composé de la combinaison de 2 sous-unités telles que RelA, RelB, c-Rel, NF- κ B1/p50 et NF- κ B2/p52, n'est plus séquestré par I κ B au sein du cytoplasme et est transloqué au niveau du noyau où il régule la transcription de nombreux gènes.

En plus de cette voie canonique d'activation de NF- κ B, une autre voie alternative peut être mise en place. Des stimuli tels que les cytokines BAFF, APRIL ou la lymphotoxine peuvent conduire à l'activation du précurseur RelB/p100 en sa forme mature p52 (**Figure I-51**).

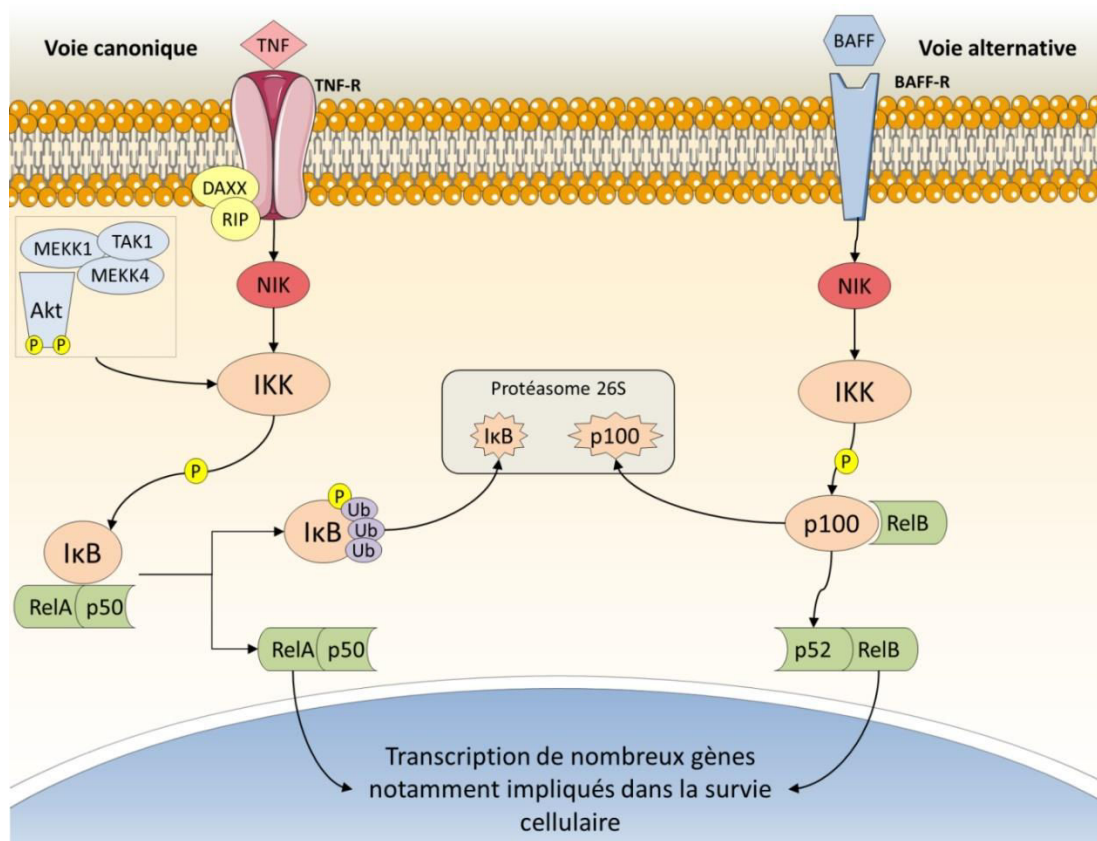


Figure I- 51– Activation de la voie NF- κ B

La voie de NF- κ B est généralement activée par des cytokines telles que TNF- α se liant aux récepteurs TNF, liaison à l'origine de l'activation de la kinase NIK (NF- κ B-inducing kinase) qui elle-même va activer le complexe I κ B kinase (IKK). Ce complexe, peut également être activé par des MAP3K telles que MEKK1, MEKK3 ou TAK1 impliquées dans les cascades des voies de JNK et ERK, mais également par Akt. Cette activation de IKK induit la phosphorylation de I κ B suivie de sa polyubiquitination et de son adressage vers le protéasome 26S où il sera dégradé. Ainsi, NF- κ B composé de la combinaison de 2 sous-unités telles que RelA, RelB, c-Rel, NF- κ B1/p50 et NF- κ B2/p52, n'est plus séquestré par I κ B au sein du cytoplasme et est transloqué au niveau du noyau où il régule la transcription de nombreux gènes impliqués notamment dans la survie cellulaire. En plus de cette voie canonique d'activation de NF- κ B, une autre voie alternative peut être mise en place. Des stimuli tels que les cytokines BAFF, APRIL ou la lymphotoxine peuvent conduire à l'activation du précurseur RelB/p100 en sa forme mature p52.



IV.3. Voies de Transduction du signal et cancer de la prostate

En cas de stade avancé de la maladie, différentes voies de signalisation oncogéniques collaborent afin de favoriser la formation des métastases et le développement de cancers prostatiques résistants à la castration (CRPC). Parmi ces voies de signalisation, sont retrouvées la voie PI3K/Akt, les voies des MAPKs et la voie de NF- κ B.

Tout d'abord, la voie PI3K/Akt impliquée dans la croissance et la prolifération cellulaire est souvent dérégulée en cas de cancer. Son activation constitutive peut être due à l'activation en continu des récepteurs membranaires impliqués dans cette voie de signalisation, ou encore due à des modifications au niveau de l'ADN (mutations, amplifications, délétions, méthylations) ou post-traductionnelles de Akt, mais aussi à l'inhibition de PTEN, l'inhibiteur de la PI3K (112). L'ensemble de ces phénomènes confère à cette voie PI3K/Akt un rôle essentiel dans l'apoptose, la transformation maligne, la formation de métastases et la résistance à la radiothérapie dans le cas du cancer de la prostate (113). En effet, il a été démontré qu'une altération de cette voie pouvait être corrélée au développement du cancer prostatique : une perte de PTEN ou une activation de la PI3K sont retrouvées dans plus de 50% des tumeurs prostatiques primaires et dans toutes les métastases de cancer de la prostate. Néanmoins, une inactivation de PTEN seule, ou en combinaison avec une délétion homozygote de p53, ne suffit pas à mimer les aspects critiques de ce stade final c'est à dire la présence de nombreuses métastases.

Il semblerait donc que d'autres mécanismes agissent en collaboration avec cette voie PI3K/Akt pour promouvoir le développement d'un cancer prostatique métastatique (114). C'est notamment le cas de la voie RAS/MAPK. En effet, l'activation de RAS/MAPK est significativement élevée à la fois dans les tumeurs primaires mais également dans les tumeurs métastatiques de la prostate. De plus, favoriser l'activation de RAS/MAPK peut réduire la dépendance des cellules cancéreuses prostatiques LNCaP pour les androgènes (115) alors que son inhibition peut restaurer une dépendance hormonale chez les cellules C4-2, normalement hormono-indépendantes (116). Cette voie représente donc un point clé dans les cancers résistants à la castration. Enfin, l'activation de RAS dans la lignée cancéreuse prostatique humaine DU 145 favorise la formation de métastases au niveau du cerveau et des os (117) montrant ainsi que cette voie a une importance certaine dans le développement tumoral prostatique.

Il est vrai que les fonctions des voies MAPKs dans la physiologie de la prostate sont loin d'être clairement toutes définies, néanmoins, il semble que la voie p38/MAPK joue également un rôle important dans la progression du cancer de la prostate. En effet, dans le tissu prostatique sain, p38/MAPK est exprimée dans les cellules basales et les cellules épithéliales de la glande prostatique et peut devenir active en cas de néoplasie ou d'hypertrophie bénigne (114). La voie p38/MAPK joue également un rôle essentiel dans l'inflammation en activant la cytokine IL-6 et son récepteur IL6-R, induisant ainsi des cascades de MAPKs qui favorisent l'angiogenèse, l'invasion cellulaire, la formation de métastases notamment au niveau des os, ainsi que la production de macrophages associés à la tumorigenèse (118). Aussi, la cyclooxygénase-2 (COX-2), régulée par p38 et souvent surexprimée en cas de cancer de la prostate, peut être impliquée dans la prolifération des cellules souches qui contrôlent l'inflammation à l'origine d'une résistance aux différents traitements.

Concernant la voie de NF- κ B, sa fonction dans l'initiation et la progression tumorales repose sur le contrôle de facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2, Bcl_{XL}, IAP1 et la survivine. NF- κ B favorise la prolifération cellulaire par induction de l'expression des cyclines D1 et D2. Enfin, NF- κ B joue un rôle dans la formation de métastases et l'angiogenèse via l'induction de cytokines telles que l'IL-6 et l'IL-8 ou de metalloprotéinases de la matrice qui peuvent être modulées par le PSMA.

Une activité constitutive de NF- κ B a été décrite dans le cadre du cancer de la prostate. En effet, la croissance des lignées cellulaires PC-3 et DU 145 dites androgéno-indépendantes repose sur des niveaux d'expression élevés de NF- κ B et l'inhibition de ce facteur de transcription par des inhibiteurs



pharmacologiques ou par une surexpression du mutant double-négatif de I κ B induit une mort cellulaire massive de ces lignées. Toutes les lignées cancéreuses prostatiques présentant une activité constitutive de NF- κ B ont également un faible niveau d'expression voire une absence d'expression des AR. Ce constat conduit à envisager que l'activation chronique de NF- κ B pourrait remplacer les AR pour assurer la survie et la prolifération cellulaire en cas de privation androgénique et le blocage de NF- κ B représenterait donc un moyen thérapeutique efficace dans le traitement des CRPC.

IV.4. Voies de transduction du signal et thérapie photodynamique

Bien que l'activation de ERK1/2 soit généralement associée à la survie cellulaire et celles de p38 et JNK liées à l'induction de l'apoptose, le rôle de chaque MAPK dans la mort cellulaire semble dépendant du type cellulaire et du contexte physiologique.

Tong et son équipe comparent les effets du Photofrin® sur les MAPKs chez une lignée normale de fibroblastes humains GM38A et une lignée de cellules de Syndrome de Li-Fraumeni immortalisées LFS087. Sous l'action du Photofrin®, la lignée normale présente une activation transitoire des 3 MAPKs suivie d'une inhibition de ERK alors que la lignée LFS087, plus résistante au PS, montre une forte activation des voies JNK, p38 et ERK. L'inhibition de ERK1/2 avec l'inhibiteur PD98,059 augmente la sensibilité des cellules LFS087 à la PDT, suggérant que cette voie protège les cellules du processus apoptotique (119). En revanche, l'inhibition de la voie p38 n'a pas d'effet sur la survie cellulaire (120).

Le PS pour lequel les effets sur les MAPKs sont les mieux caractérisés est l'hypéricine. En effet, sa photoactivation induit l'activation de JNK et l'inhibition de ERK2 dans les cellules de carcinome épidermoïde humain (A431), les kératinocytes humains (HaCaT), les fibroblastes murins (L929) et les cellules d'adénocarcinome utérin humain (HeLa). Ces dernières montrent également une forte activation de p38. L'utilisation d'inhibiteurs de caspases prévient la mort des cellules HeLa mais n'a pas d'effet sur l'activation de JNK et p38. En revanche, l'inhibition de JNK et p38 favorise la mort cellulaire induite par l'hypéricine, suggérant que ces MAPKs jouent un rôle important dans le phénomène de résistance au traitement (121).

Aussi, certains patients traités par PDT dans le cadre de cancers épidermoïdes de la peau avec le 5-ALA, présentent parfois des résistances au traitement. L'utilisation de PD98,059 (inhibiteur de ERK), SB203580 (inhibiteur de p38) et SP600125 (inhibiteur de JNK), a permis d'améliorer les effets cytotoxiques de la PDT par le 5-ALA dans les cellules SCL-1 (lignée de carcinome épidermoïde humain) (122).

De plus, la PDT induit une activation du facteur de transcription NF- κ B dans différents modèles cellulaires et via l'utilisation de différents PS mais son rôle dans le processus de PDT reste encore peu connu.

La première étude ayant démontré l'activation de NF- κ B concerne l'utilisation de Photofrin® sur les cellules leucémiques murines L1210. Des résultats similaires ont été obtenus chez les cellules leucémiques promyélocytaire HL-60 traitées avec la vertéporfine (dérivé mono-acide d'une benzoporphyrine), mais aussi dans les cellules HeLa et les cellules T24 traitées par l'hypericine ou encore les cellules de glioblastome U87 traitées par le 5-ALA. Dans ces dernières, l'inhibition de NF- κ B induit une diminution de l'activation de la caspase-3 et favorise l'induction de nécrose, suggérant que ce facteur de transcription présente des caractéristiques pro-apoptotiques et anti-nécrotiques (123), caractéristiques pro-apoptotiques inattendues puisque NF- κ B est surtout connu comme facteur de survie cellulaire.



Enfin, les effets de l'inhibition de ces différentes voies de signalisation ont été étudiés dans les cellules de cancer de la bouche Ca9-22 traitées par PDT avec le 5-ALA. L'utilisation du BAY11-7082, du SB203580, du PD98,059, du SP600125, et du Go6983 qui inhibent respectivement l'activité de NF- κ B, p38, ERK, JNK et de la PKC montrent que l'inhibition de NF- κ B et JNK inhibe presque complètement l'apoptose induite par la photoactivation du 5-ALA. Cependant, l'inhibition de ERK, p38 ou PKC n'ont pas ou peu d'effet sur le mécanisme de mort cellulaire programmée. Dans ce modèle, NF- κ B joue donc aussi le rôle d'inducteur de l'apoptose (100).

Il semblerait donc que le rôle de chaque MAPK dans la mort cellulaire dépende du type cellulaire étudié, du contexte physiologique et du PS utilisé. Malgré les capacités de la PDT à induire le phénomène de mort dans les cellules cancéreuses, certaines arrivent cependant à mettre en place des voies de résistance contre ce traitement. Parmi celles-ci, en plus des MAPKs et du facteur de transcription NF- κ B, on peut retrouver la voie de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et la voie autophagique.



Chapitre V. La cyclooxygénase-2 et son inhibition

Durant plusieurs millénaires, les feuilles et l'écorce de saule ont été utilisées afin de soulager fièvre et douleurs. Cependant, ce n'est qu'en 1893 que Felix Hoffmann, un chimiste allemand employé chez Bayer, synthétise l'acide acétylsalicylique mieux toléré que l'acide salicylique extrait de la plante (**Figure I-52**). La marque Aspirine® est déposée en 1899 et les premiers comprimés sont fabriqués en 1900 (10000 tonnes d'Aspirine® sont produites par an actuellement).

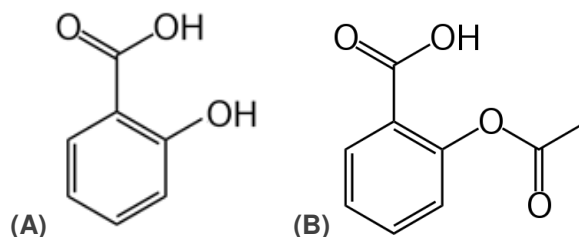


Figure I- 52- Structure de l'acide salicylique (A) et de l'acide acétylsalicylique ou Aspirine® (B)

Ce n'est qu'en 1971 que Priscilla Piper et John Vane découvrent le mode d'action de l'acide acétylsalicylique et des autres molécules de la famille des anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) (124) : l'inhibition des cyclooxygénases (COXs) également appelées prostaglandine endopéroxyde G/H synthases (PGHS) dont la fonction principale est la synthèse des prostanoïdes à partir de l'acide arachidonique (AA). Les AINS sont aujourd'hui une des classes de médicaments les plus utilisés dans le monde pour soulager des symptômes de l'inflammation et de la douleur. Le rôle des COXs dans le cancer a également été souligné, et a relancé la recherche de nouveaux composés actifs et de nouvelles applications thérapeutiques pour cette cible.

V.1. Les cyclooxygénases

V.1.1. La structure des COXs

Les cyclooxygénases (COXs) sont des glycoprotéines membranaires homodimériques. Chaque monomère est composé d'un domaine N-terminal dit « Epidermal Growth Factor-like ou EGF-like », un domaine de liaison à la membrane et un domaine C-terminal catalytique.

V.1.1.1. Le domaine N-terminal EGF-like

Le domaine EGF-like apparaît comme étant le domaine de dimérisation. Il permet le maintien des deux monomères entre eux et ceci à travers des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes et des ponts salins (125).

V.1.1.2. Le domaine de liaison à la membrane

Le domaine de liaison membranaire des COXs comprend quatre hélices alpha qui créent une surface hydrophobe pouvant s'intégrer dans un seul feuillet de la bicouche lipidique, notamment du côté luminal du réticulum endoplasmique (RE) et de l'enveloppe nucléaire (126). Cette conformation permet de créer un canal hydrophobe permettant de libérer l'acide arachidonique présent au cœur de la bicouche lipidique.



V.1.1.3. Le domaine C-terminal catalytique

Le domaine catalytique (représentant 80% de la protéine) comprend 2 sites catalytiques distincts : un site cyclooxygénase et un site peroxydase. Il existe deux acides aminés essentiels à l'activité de cyclooxygénation sur l'acide arachidonique : la tyrosine en position 385 initie la réaction enzymatique, sert de passerelle vers le site de peroxydation et intervient dans la réaction d'oxydation et l'arginine en position 120 qui, par son groupement guanidine, interagit avec la fonction acide de l'acide arachidonique et avec certains AINS pour assurer la bonne position du ligand. Un noyau hème présent dans un site voisin totalement indépendant du site de cyclooxygénation, est également indispensable à l'activité peroxydase.

V.1.2. Les différents isoformes des COXs

La cyclooxygénase-1 ou COX-1 est codée par le gène Ptgs-1 situé sur le bras long du chromosome 9 chez l'Homme, COX-1 est une protéine ubiquitaire de 599 acides aminés présentant un poids moléculaire de 70 KDa. Elle est constitutivement exprimée dans tous les tissus, ses métabolites prostanoides étant nécessaires à l'homéostasie tissulaire par modulation de divers processus cellulaires notamment la prolifération cellulaire et l'angiogenèse (126). La cyclooxygénase 2 ou COX-2, quant à elle, est une enzyme inductible de 604 acides aminés de 72 KDa codée par le gène Ptgs-2 situé sur le bras long du chromosome 1. Elle est absente dans la plupart des tissus normaux mais rapidement mobilisée dans les conditions pathologiques telles que l'inflammation et le cancer.

Les isoformes COX-1 et COX-2 présentent environ 60% d'homologie de structure. Cependant, la substitution de l'isoleucine en position 523 dans la COX-1 avec une valine dans la COX-2, soit la perte d'un groupement méthyle, est suffisante pour créer une poche secondaire latérale hydrophobe interne à l'origine d'une augmentation d'environ 25% du volume du site catalytique chez COX-2. Ce phénomène explique la reconnaissance par COX-2 de substrats plus volumineux (125). D'autres changements concernant l'arginine et la tyrosine respectivement en position 120 et 355, permettent une plus grande ouverture (de l'ordre de 17%) du canal dans la COX-2 (**Figure I-53**).

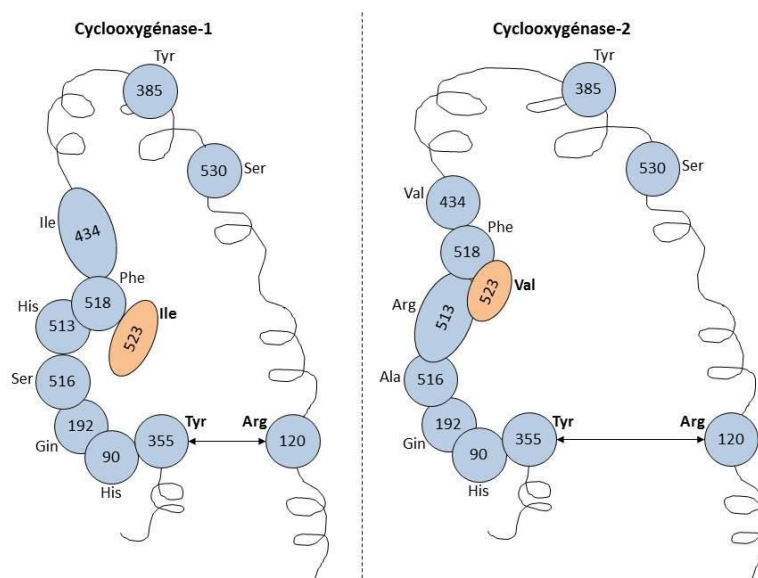


Figure I- 53 - Homologie de structure entre COX-1 et COX-2.

Les 2 isoformes présentent 60% d'homologie de structure mais la substitution de l'isoleucine (Ile) 523 de COX-1 par une valine (Val) dans COX-2 crée une poche secondaire latérale hydrophobe interne à l'origine d'une augmentation d'environ 25% du volume du site catalytique chez COX-2. D'autres changements de l'arginine (Arg) 120 et la tyrosine (Tyr) 355 permettent une plus grande ouverture (de l'ordre de 17%) du canal dans la COX-2. (125)



Ces différences ne conduisent pas à une modification de l'activité de l'enzyme vis-à-vis de son substrat naturel qu'est l'acide arachidonique. En revanche, d'un point de vue pharmacologique, ce type de modifications va permettre un design efficace de nouveaux médicaments plus sélectifs de telle ou telle isoforme ; à noter que COX-2 présente un site de liaison aux AINS différent, ce qui fait de COX-2 une cible préférentielle en comparaison à COX-1 (127).

V.1.3. La fonction principale des COXs : la formation de prostanoides

La fonction principale des COXs est la conversion d'acides gras polyinsaturés (AGPI), tel que l'acide arachidonique, en prostanoides. Le terme « prostanoides » désigne l'ensemble des composés issus de la voie des COXs tels que les prostaglandines (PG), les thromboxanes (TX) et les prostacyclines.

V.1.3.1. L'acide arachidonique et la phospholipase A₂

L'acide arachidonique est un acide gras polyinsaturé comportant 20 atomes de carbones et quatre liaisons éthyléniques situées sur les atomes de carbone 5, 8, 11 et 14. Il s'agit d'un acide gras synthétisé par élongation de l'acide linoléique apporté par l'alimentation. L'AA n'est peu ou pas présent à l'état libre dans le cytoplasme des cellules animales mais préférentiellement estérifié en position sn-2 des glycérophospholipides membranaires. La principale voie de libération de l'AA des phospholipides membranaires est catalysée par les phospholipases A₂ ou PLA₂, enzymes à l'origine de l'hydrolyse de cette liaison ester en position sn-2 des glycérophospholipides membranaires (Figure I-54).

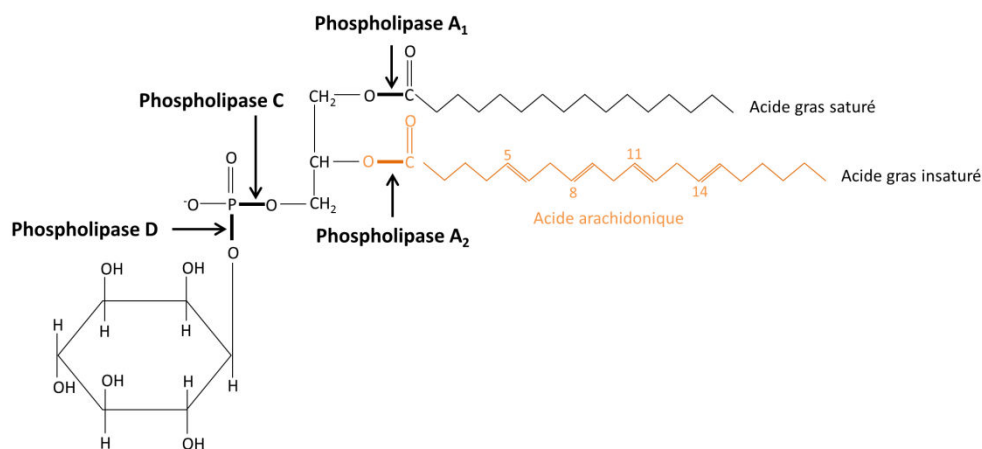


Figure I- 54 – Voie de libération de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires. La phospholipase A₂ (PLA₂) libère l'acide arachidonique (AA) par hydrolyse de la liaison ester en position sn-2 des phospholipides membranaires.

Une fois l'AA libéré des phospholipides membranaires, il peut être métabolisé par divers systèmes enzymatiques tels que les lipoxygénases (LOXs) et les cyclooxygénases (COXs) permettant respectivement la synthèse de leucotriènes et d'acides hydroxyeicosatétraénoïques et la synthèse de prostanoides tels que les prostaglandines (PG), les thromboxanes (TX) et les prostacyclines. L'ensemble de ces composés biologiquement actifs est regroupé sous le terme « eicosanoïdes ».



V.1.3.2. Métabolisme de l'AA par la voie des COXs

Dans un premier temps, la COX, par son site de cyclooxygénation et plus précisément la tyrosine en position 385, arrache un proton à l'AA et lui ajoute deux molécules d'oxygène pour former PGG₂, un intermédiaire peroxydé instable. Dans un second temps, la COX, à la fois via cette tyrosine en position 385 et le noyau hème de son site peroxydase, réduit PGG₂ pour donner PGH₂, un endopéroxyde également instable agissant en tant que substrat intermédiaire de la biosynthèse des prostanoïdes par des synthétases spécifiques.

L'ensemble de ces prostanoïdes ont à la fois une fonction autocrine et paracrine par activation de deux classes de récepteurs : la famille des récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) (α , β , γ) qui agissent directement comme facteurs de transcription après fixation du ligand et la famille des récepteurs à sept domaines transmembranaires couplés aux protéines G hétérodimériques qui sont spécifiques à certains prostanoïdes pour induire différentes voies de transduction (128) (**Figure I-55**).



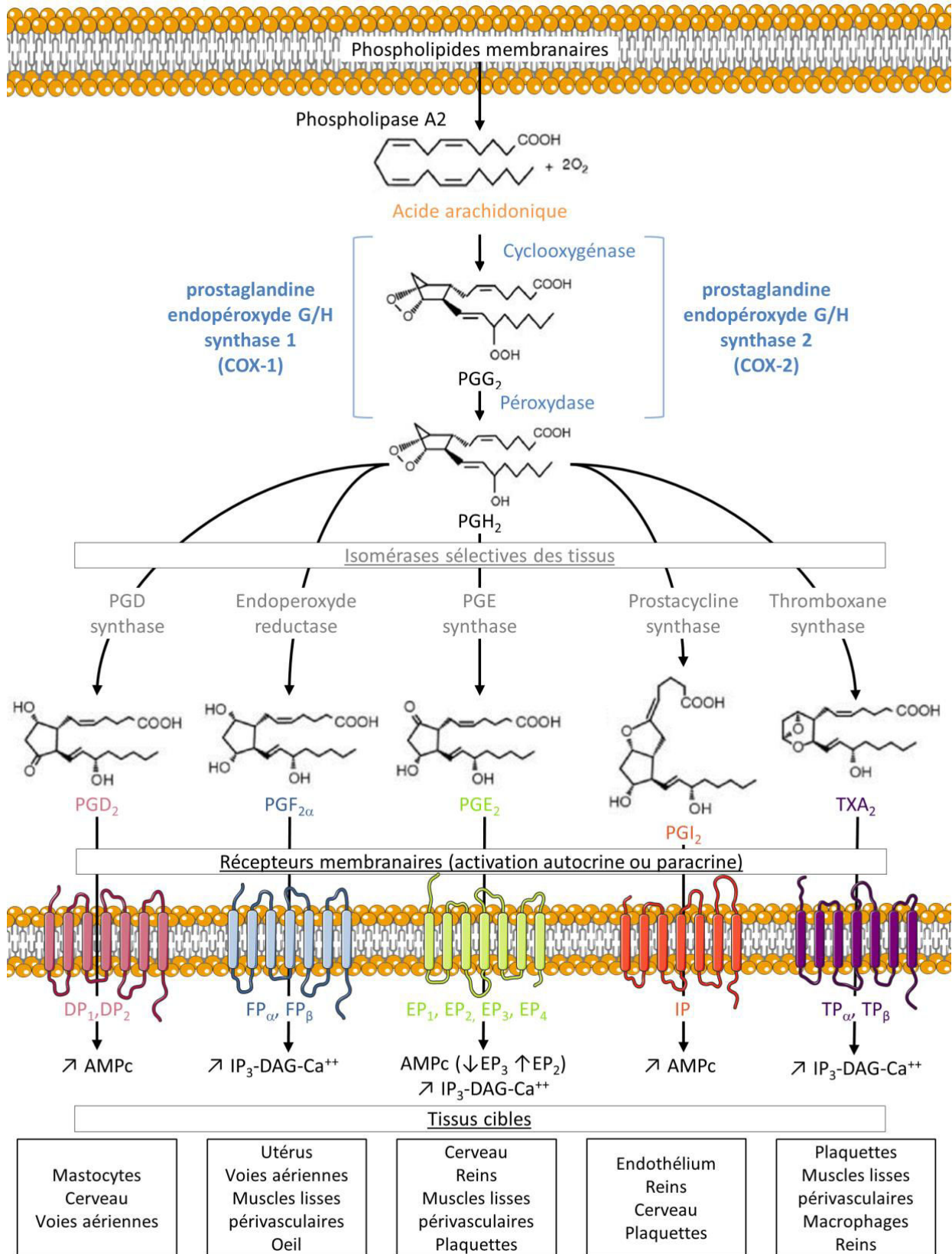


Figure I- 55 – Cascades de biosynthèse des prostanoïdes.

L'acide arachidonique (AA) est libéré de la membrane phospholipidique grâce à l'action hydrolase de la phospholipase A₂ (PLA₂). Il est ensuite pris en charge par les cyclooxygénases (COXs) pour former des prostanoïdes sous l'action de synthèses spécifiques. Ces prostanoïdes vont se lier à des récepteurs spécifiques à l'origine d'un large panel de phénomènes biologiques. D'après Hussain et al., 2003 (129).



V.2. La régulation de la cyclooxygénase-2

Il existe plusieurs niveaux de régulation de la cyclooxygénase-2 : une régulation transcriptionnelle, une régulation post-transcriptionnelle et une régulation post-traductionnelle (**Figure I-53**).

V.2.1. La régulation transcriptionnelle de COX-2

D'un point de vue transcriptionnel et de manière générale, l'induction de COX-2 est sous la dépendance des MAPK telles que la voie ERK1/2, la voie JNK/SAPK, et la voie p38. En effet, ces voies de transduction convergent vers l'activation de facteurs de transcription susceptibles de se fixer au niveau de la région promotrice du gène codant COX-2. Le promoteur de COX-2 comporte plusieurs séquences régulatrices spécifiques de la fixation de différents facteurs de croissance dont NF- κ B, CRE (cAMP Responsive Element binding protein) et AP-1 (Activator Protein-1) (130). En opposition à ces activateurs de COX-2, la signalisation PPAR- γ et la signalisation des glucocorticoïdes sont capables de réprimer la transcription de COX-2 en interférant dans la fixation des facteurs NF- κ B et AP-1 sur le promoteur de COX-2 (**Figure I-56**).

La régulation transcriptionnelle de COX-2 peut également être influencée par le remodelage de la chromatine. En effet, la région flanquante non transcrite en 5' du gène de la COX-2 comporte plusieurs îlots CpG (Cytosine-Guanine-rich dinucleotides). Une étude *in vitro* sur des lignées de carcinome gastrique a mis en évidence le fait que lorsque ces îlots CpG sont hyperméthylés, ils sont responsables d'une répression de la transcription du gène alors que leur hypométhylation induit une réactivation de la COX-2 (131). Enfin, il a été démontré, grâce à l'utilisation d'inhibiteurs de la HDAC (Histone DésAcétylase), qu'une hypo-acétylation du promoteur de COX-2 induit une répression de son activation en empêchant la liaison du facteur de transcription c-Jun au promoteur de COX-2 (132).

V.2.2. La régulation post-transcriptionnelle de COX-2

D'un point de vue post-transcriptionnel, la régulation de COX-2 passe par le changement de la stabilité de son ARNm et ceci via les éléments riches en AU (ARE) et via les microARN (miR).

L'ARNm de COX-2 possède, dans sa région 3'-UTR, des séquences ARE comportant plusieurs copies du motif consensus AUUUA, sur lesquelles peuvent se lier différents facteurs tels que CUGBP2 (CUG triplet repeat, RNA-Binding Protein 2) ou HuR (Human antigen R) à l'origine de la stabilisation de l'ARNm de COX-2 et donc de son activation. En effet, HuR régule positivement l'expression de COX-2 en stabilisant son ARNm par inhibition de la dégradation de sa queue poly(A). HuR est une cible de PKC et de p38 : son activité peut être modulée par phosphorylation par les isoformes de PKC, résultant par sa translocation dans le cytoplasme. De plus, p38 stimule le transfert de HuR dans le cytosol et affecte l'activité de son ARNm (133) (**Figure I-56**).

La stabilité de l'ARNm de COX-2 peut également être régulée via des microARN soit des ARN non codants d'approximativement 22 nucléotides hautement conservés et jouant un rôle important dans la prolifération cellulaire, l'apoptose et la formation de métastases. Ces microARN régulent 30% des gènes codant pour des protéines, et 50% d'entre eux sont localisés au niveau de régions génomiques impliquées dans la cancérogenèse. Ainsi, ces microARN sont impliqués dans le développement cancéreux en régulant les gènes suppresseurs de tumeur ou des oncogènes.

Concernant la COX-2, les microARN ont la capacité de se lier à la région 3'UTR de son ARNm. Des études récentes ont montré que les microARN suppresseurs de tumeur tels que miR-101, miR-126, miR-146a, miR-330, miR-34 et les membres de la famille miR-200 sont régulés à la baisse dans le tissu cancéreux prostatique en comparaison au tissu sain. Une perte de miR-101 est corrélée à



une surexpression de l'histone méthyltransférase EZH2. Ainsi, l'expression de EZH2 peut être régulée par l'expression de miR-101 en vue d'inhiber la croissance du cancer prostatique. Aussi, miR-101 a la capacité de cibler COX-2 en cas de cancer colorectal (134) de cancer gastrique (135) et de cancer de la prostate (136). Une expression exogène de miR-101 permet d'inhiber l'expression de COX-2 dans le tissu tumoral prostatique et inhibe la croissance tumorale.

V.2.3. La régulation post-traductionnelle de COX-2

La protéine COX-2 peut être sujette à différentes modifications telles que la N-glycosylation concomitante à la traduction et la S-nitrosylation, la phosphorylation et l'acétylation qui agissent sur la protéine déjà synthétisée (**Figure I-56**).

La N-glycosylation consiste en la fixation d'oligosaccharides sur les résidus asparagine de COX-2. Elle est indispensable à l'acquisition d'une conformation permettant l'insertion du noyau hème, la formation de dimères et l'insertion dans le réticulum endoplasmique nécessaire pour acquérir une conformation native. Ce mécanisme joue également un rôle dans la dégradation de la protéine. En effet, le remplacement des résidus asparagine par des résidus glutamine (sites non sujets à la N-glycosylation) induit une augmentation de la quantité de protéine COX-2.

De plus, la S-nitrosylation et la phosphorylation, responsables respectivement d'un transfert d'un oxyde nitrique (NO) vers le thiol d'un résidu cystéine et d'un ajout de groupements phosphate (sur des résidus tyrosine, sérine ou thréonine), permettent l'augmentation de l'activité de la COX-2.

Enfin, l'acétylation, soit l'addition d'un groupement acétyl sur les résidus lysine, a lieu au niveau du site catalytique de la COX-2 et induit son inactivation. Ce mécanisme est le mode d'action des AINS tels que l'aspirine.



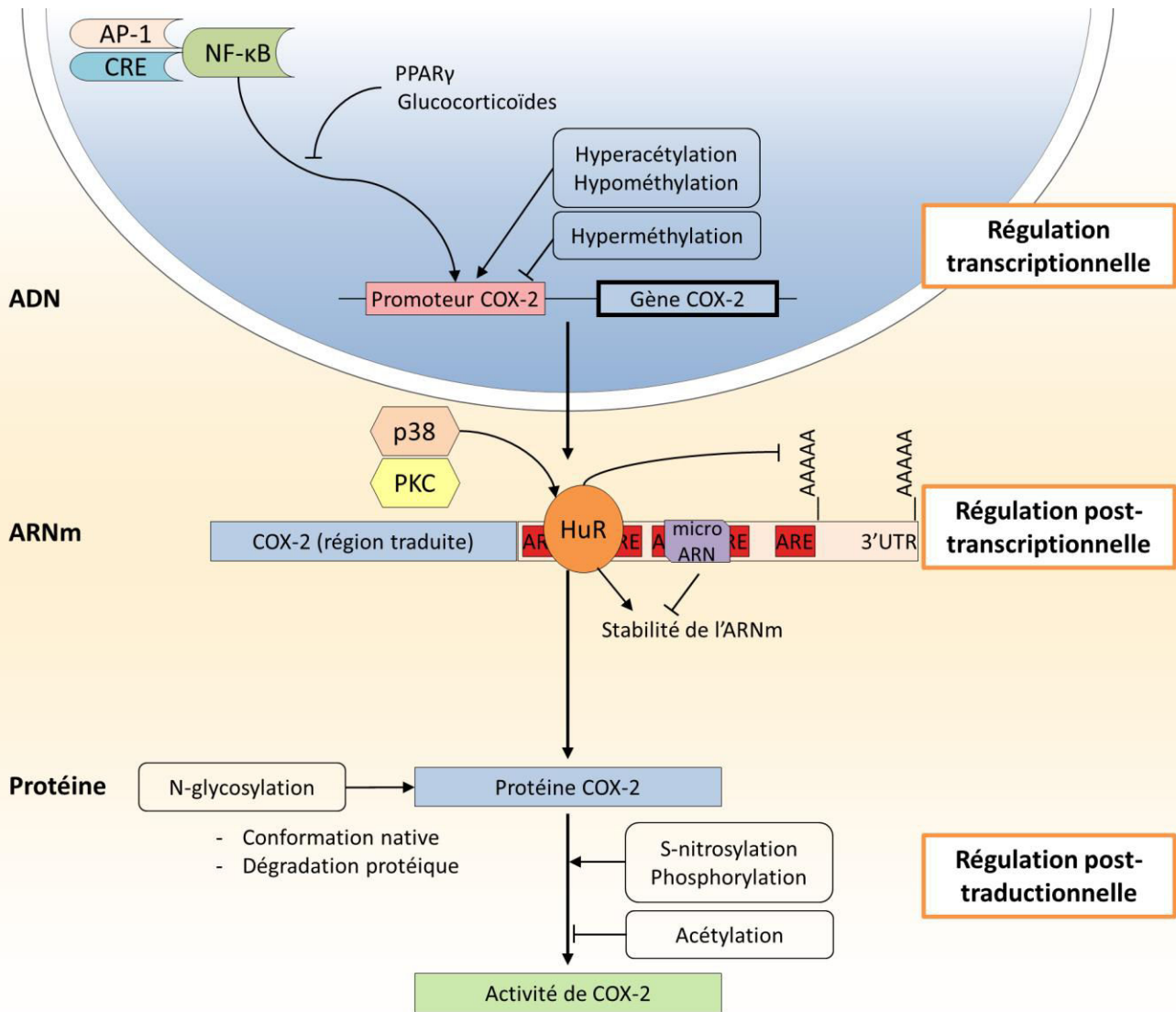


Figure I- 56 – Régulation de la cyclooxygénase-2.

Il existe plusieurs niveaux de régulation de COX-2 : une régulation transcriptionnelle via des facteurs de transcription (AP-1, CRE, NF-κB) et le remodelage de la chromatine (acétylation et méthylation), une régulation post-transcriptionnelle par le changement de la stabilité de l'ARNm de COX-2 via les régions ARE et les microARN, et une régulation post-traductionnelle via des modifications de COX-2 qui régulent sa conformation, sa dégradation et son activité.

V.3. La prostaglandine E₂, métabolite principal de la voie des COXs

Parmi la variété de prostanoides synthétisés à partir de l'acide arachidonique, la prostaglandine E₂ (PGE₂) est le métabolite le plus étudié dans le cadre du développement de nouvelles thérapies anticancéreuses. En effet, à la différence des autres prostanoides, la PGE₂ présente une stabilité importante l'identifiant comme métabolite principal de l'acide arachidonique.

Une fois synthétisée, la PGE₂ n'est pas stockée au sein de la cellule mais libérée à l'aide de transporteur des prostaglandines (PGT) ou par diffusion passive. C'est ensuite qu'elle pourra agir de façon autocrine ou paracrine en activant les récepteurs couplés à la protéine G que sont les récepteurs EP1, EP2, EP3 et EP4. Ces 4 récepteurs sont codés par 4 gènes différents dont l'alignement de séquences ne révèle qu'une homologie de séquence de l'ordre de 20 à 30%, homologie correspondant au site de reconnaissance de la PGE₂ situé en N-terminal. La variabilité de l'extrémité C-terminale de ces récepteurs leur permet de se lier à différentes protéines G, conférant ainsi à la PGE₂ de nombreuses fonctions dans l'organisme. EP1 est couplé à la phospholipase C pour générer des seconds messagers tels que l'inositol triphosphate impliqué dans la libération de



calcium intracellulaire et de diacylglycérol, un activateur de la protéine kinase C (PKC). EP2 et EP4 sont couplés à l'adénylate cyclase et produisent de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) qui active la voie de la protéine kinase A (PKA). EP3 inhibe l'AMPc et favorise la production de calcium et d'inositol triphosphate.

V.4. Implication de la voie COX-2 dans le cancer de la prostate

L'inflammation chronique représente une des causes majeures du développement de cancers chez l'Homme, et notamment le cancer de la prostate. En effet, le fonctionnement de la glande prostatique peut être sous l'influence de facteurs environnementaux tels que des agents infectieux, des carcinogènes alimentaires ou encore un déséquilibre hormonal, à l'origine d'une inflammation chronique de la glande et de lésions régénératives appelées atrophies inflammatoires prolifératives. Ces dernières, responsables d'une infiltration anormale des cellules inflammatoires, peuvent être impliquées dans le développement d'un adénocarcinome prostatique.

La COX-2 semble jouer un rôle important dans la carcinogenèse tant par son expression cellulaire et son activité métabolique que par les effets physiologiques des prostanoïdes. En effet, une surexpression de COX-2 a été retrouvée dans de nombreux types de cancers tels que le cancer du sein (137), le cancer de l'estomac, le cancer colorectal (138), les leucémies ou encore le cancer de la prostate (139). Une augmentation progressive de l'expression de COX-2 a également été mise en évidence chez des patients présentant des adénocarcinomes prostatiques (140) (**Figure I-57**).

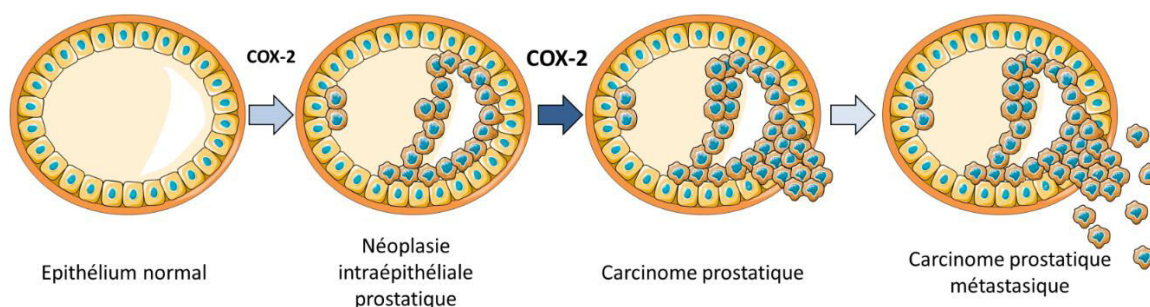


Figure I- 57 – Implication de la cyclooxygénase-2 dans la cancérogenèse prostatique. D'après Hussain et al. 2003, (129).

V.4.1. Initiation et promotion de la tumeur

De par sa nature, le métabolisme de l'AA est une source d'agents cancérigènes : les intermédiaires peroxydes que sont la PGG₂ et la PGH₂ représentent une source potentielle de radicaux libres, dangereux pour l'organisme car pouvant former des adduits avec l'ADN (141).

La COX-2 est elle-même directement impliquée dans l'activation de certaines substances pro-cancérigènes environnementales ou alimentaires et dans le métabolisme de xénobiotiques dans les tissus non hépatiques à l'origine de la formation de carcinogènes tels que le benzo[a]pyrène-7,8-diol-9,10-époxyde (142) induisant ainsi des altérations au niveau de l'ADN. COX-2 peut également activer des protéines cellulaires impliquées dans la progression tumorale (143).

La prostaglandine E₂ (PGE₂) influence également l'installation du processus tumoral par l'intermédiaire de deux voies : l'activation de la voie de survie cellulaire PI3K/Akt, et l'activation de facteurs de croissance stimulant l'intervention des voies de signalisation (Ras/MAPK, JAK/STAT).



V.4.2. Résistance à l'apoptose

COX-2 semble jouer un rôle important dans le processus d'apoptose puisqu'il est connu que l'inhibition de COX-2 est corrélée à une augmentation du processus apoptotique dans de nombreux types de cancer. Plusieurs hypothèses quant aux mécanismes impliquant COX-2 dans une résistance à l'apoptose ont vu le jour.

Tout d'abord, l'inhibition de COX-2 a été liée à une augmentation concomitante du taux intracellulaire d'acide arachidonique. En effet, une forte concentration d'AA exogène peut provoquer l'apoptose, indépendamment de la formation de prostaglandines. Dans les cellules cancéreuses colorectales humaines HT-29, l'accumulation d'AA conduit à l'induction du processus apoptotique, notamment via l'inhibition de Bcl-2 (144). Il est possible que l'expression de COX-2 soit augmentée afin de réduire la quantité d'AA dans la cellule et prévenir l'apoptose.

De plus, l'action de la COX-2 dans les processus de cancérisation passe également par les effets biologiques de ses métabolites. COX-2 induit la production de prostaglandine I₂ qui peut lier et activer PPAR δ . Cela suggère que l'inhibition de COX-2 induirait une inhibition de PGI₂ et une inactivation de PPAR δ qui, elle, serait responsable de l'inhibition de la protéine 14-3-3. Bad serait ainsi libérée de celle-ci pour ainsi exercer ses effets pro-apoptotiques (145).

Aussi, la liaison de la PGE₂ à ses récepteurs spécifiques tels que EP₁, EP₂, EP₃ et EP₄ induit l'activation de voies de survie (Akt, ERK...), une augmentation de l'expression de la protéine Bcl-2 ou encore une activation du facteur de survie NF- κ B, tous ces phénomènes pouvant être à l'origine d'une résistance à l'apoptose (146). Ainsi, l'utilisation du NS-398, un inhibiteur sélectif de l'activité de COX-2, induit une inhibition de la production de PGE₂ accompagnée par l'induction du phénomène d'apoptose et l'inhibition de l'expression de Bcl-2 dans la lignée cancéreuse prostatique humaine LNCaP présentant un fort niveau d'expression de COX-2 (147).

V.4.3. Angiogenèse

COX-2 est connue pour être impliquée dans la régulation de l'angiogenèse, processus de développement de vaisseaux capillaires à partir de capillaires préexistants, à la fois dans les tissus sains et les tissus tumoraux. En effet, ce phénomène intervient notamment dans la cicatrisation mais joue également un rôle dans la formation de tumeurs. Les effets de COX-2 peuvent apparaître via plusieurs voies : l'augmentation de l'expression des médiateurs proangiogéniques tels que VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) et bFGF (basic Fibroblast Growth Factor) (148), la stimulation de la néovascularisation directement via les produits de l'activité de COX-2 (les eicosanoïdes proangiogéniques – le thromboxane A₂, la PGE₂ et la PGI₂) et l'inhibition du phénomène d'apoptose sur les cellules endothéliales via la stimulation de Bcl-2 et de la voie Akt.

Le rôle physiologique des récepteurs EP dans les tissus sains et les tissus cancéreux est déterminé par de multiples facteurs tels que le type cellulaire, l'affinité de ces récepteurs à leurs ligands et l'existence en parallèle d'autres voies de transduction. Les récepteurs EP sont impliqués dans la promotion de la carcinogenèse dans le cadre du cancer pulmonaire, ovarien, colorectal, mais également prostatique. En effet, ils sont capables de cibler une multitude de voies de signalisation et d'induire une augmentation de VEGF dépendante de PKA, des voies dépendantes de HIF-1 α , de c-fos, de la voie PI3K/Akt, de la voie ERK et de la β -caténine.

Malheureusement, l'étude de l'expression des récepteurs EP dans les tissus prostatiques et leur rôle direct dans la carcinogenèse prostatique est limitée. Il a été démontré que ce sont les récepteurs EP₂ et EP₄ qui sont majoritairement exprimés dans les trois lignées cancéreuses prostatiques humaines PC-3, DU 145 et LNCaP et qu'ils sont impliqués dans l'expression de c-fos via la voie PKA dans les cellules PC-3 (149). De plus, la lignée PC-3 présente une expression plus



importante de EP2 et EP4 en comparaison aux deux autres lignées (150). Dans cette lignée, la PGE₂ induit une sécrétion de VEGF médiée par EP2/AMPC et non par la voie d'ERK ou la voie Akt, voies dont l'activation est tout de même corrélée avec le niveau d'expression de PGE₂ dans cette lignée cellulaire. Le récepteur EP démontré comme inducteur d'évènements moléculaires dans les cellules cancéreuses prostatiques, apparaît comme une cible potentielle intéressante quant à la thérapie du cancer de la prostate.

V.4.4. Invasion des tissus et métastases

La voie COX-2/PGE₂ joue également un rôle dans l'invasion des cellules cancéreuses et la formation de métastases dans de nombreux types de cancer.

Tout d'abord, Tsujii et al. ont montré qu'une surexpression de COX-2 induit la synthèse des MMPs et donc facilite la mobilité des cellules tumorales dans la matrice (151). De plus, COX-2 induit une diminution de l'expression de la E-cadhérine (152) expliquant l'effet inducteur de COX-2 sur le détachement des cellules cancéreuses, leur passage et leur progression dans la circulation sanguine ou le réseau lymphatique.

Enfin, la PGE₂ joue également un rôle important dans l'invasion tumorale. En effet, Ma et al. ont étudié le rôle des 4 types de récepteurs de la PGE₂ dans la formation de métastases. Ils ont démontré que la PGE₂ peut augmenter le nombre de métastases (153).

L'ensemble de ces implications de la voie COX-2/PGE₂ dans le développement du cancer tend à développer des stratégies d'inhibition de COX-2 afin de lutter contre ses effets pro-cancéreux.

V.5. L'inhibition de COX-2 comme nouvelle stratégie anticancéreuse

En dépit des larges progrès en matière de stratégie de lutte contre le cancer, de nombreuses tumeurs restent résistantes aux traitements thérapeutiques conventionnels. De nombreuses recherches suggèrent que les inhibiteurs de COX-2 sont responsables de l'inhibition de la prolifération cellulaire et de l'induction du processus apoptotique dans de nombreux modèles cancéreux. Ainsi, de futurs protocoles thérapeutiques envisagent l'administration de ces inhibiteurs, aussi bien seuls qu'en combinaison avec d'autres protocoles cliniques anti-cancéreux, dans le but de favoriser la mort des cellules cancéreuses.

La radiothérapie est le traitement le plus fréquemment utilisé en cas de tumeur solide telle que le cancer du sein, de la prostate, du colon et du poumon. Il est connu que les propriétés anti-cancéreuses des rayonnements ionisants sont dues à l'induction de cassures d'ADN double brin dans les cellules en prolifération, suivie du processus apoptotique. Des études ont montré que la radiosensibilité des cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3 était favorisée suite à l'inhibition de COX-2 par siRNA. Le NS-398, inhibiteur sélectif de l'activité de COX-2, était capable d'augmenter la radiosensibilité des cellules PC-3 exprimant COX-2 contrairement à celle des cellules PC-3 dépourvues en COX-2 (154). Cependant, la combinaison d'inhibiteurs de COX-2 a aussi conduit à une réduction de l'efficacité de la radiothérapie de lignées cellulaires de cancer de la tête et du cou (SCC9 et SCC25) (155). Cela suggère que la sensibilisation des tumeurs à la radiation est fortement dépendante du type de cellules tumorales.

De nombreux cancers sont également traités avec des agents chimio-thérapeutiques conduisant également à l'inhibition de la prolifération cellulaire et l'induction de l'apoptose. Il a été montré que la combinaison d'inhibiteurs de COX-2 augmente l'efficacité de la chimiothérapie à la fois dans des modèles cellulaires et au cours d'essais cliniques.



Dans le cadre de la PDT, plusieurs paramètres affectent son efficacité : la distribution du PS, le photo-blanchiment et la vascularisation de la tumeur. La raison majeure d'échec de cette approche thérapeutique est liée à l'augmentation des facteurs angiogéniques et inflammatoires du microenvironnement tumoral. Il a été démontré que l'expression de COX-2 est fortement induite durant un traitement par la PDT dans différents modèles de cancer. Comme pour la radiothérapie et la chimiothérapie, COX-2 représente une cible potentielle pour augmenter l'efficacité de la PDT.

L'utilisation *in vitro* de célécoxib, inhibiteur spécifique de COX-2, dans les cellules mammaires murines BA, permet d'augmenter l'efficacité du Photofrin® en favorisant l'apoptose par activation de la caspase-3, clivage de la protéine PARP et dégradation de Bcl-2. Néanmoins, *in vivo*, la photosensibilisation des cellules via l'utilisation du célécoxib et du NS-398, n'est pas due à l'exacerbation du processus apoptotique mais à la diminution du niveau d'expression des facteurs angiogéniques tels que TNF α , VEGF, PGE₂ et MMP9 (156).

Au contraire, Makowski et al. ont démontré que le rofécoxib, le NS-398 et le nimésulide, tous des inhibiteurs de COX-2, sont incapables de potentialiser les effets du Photofrin® sur des cellules C-26 (adénocarcinome colorectal) *in vitro*. Cependant, *in vivo*, le nimésulide augmente l'efficacité de la PDT effectuée sur les cellules C-26 greffées sur des souris. Sachant que les inhibiteurs de COX-2 sont connus pour leurs effets anti-angiogéniques et que les dommages vasculaires sont un facteur important quant à l'efficacité de la PDT, il a été suggéré que ces effets anti-angiogéniques pouvaient être responsables de cet effet anti-tumoral retrouvé uniquement *in vivo*.

Le traitement des cellules Hela (cancer du col de l'utérus) et T24 (carcinome de la vessie) par l'hypéricine induit une augmentation du taux de PGE₂ via la voie p38/MAPK et induit également le processus apoptotique via la voie intrinsèque. L'inhibition de p38 est associée à une augmentation de la photosensibilité des cellules contrairement à l'utilisation d'inhibiteurs de COX-2. Dans ce modèle, COX-2 ne semble pas être impliquée dans un phénomène de résistance à la PDT (157).

Ainsi, le lien entre COX-2 et l'efficacité de la PDT reste encore mal connu. Comme dans le cadre de la radiothérapie ou la chimiothérapie, il semblerait que l'effet des inhibiteurs de COX-2 en PDT soit dépendant du type cellulaire étudié.

Il reste néanmoins important de noter que, dans un même modèle cellulaire, l'utilisation de différents inhibiteurs de COX-2 peuvent moduler l'apoptose suivant des mécanismes différents. Par exemple, dans la lignée cancéreuse prostatique humaine LNCaP COX-2 positive, le célécoxib induit l'apoptose par inhibition de la phosphorylation de Akt sans affecter le niveau d'expression de Bcl-2 (158) alors qu'au contraire, le NS-398, induit l'apoptose via une diminution d'expression de Bcl-2 (147). Ces résultats suggèrent que ces inhibiteurs de COX-2 peuvent avoir des effets sur le processus apoptotique COX-2-indépendants. Cette constatation conforte l'idée de considérer d'autres stratégies expérimentales d'inhibition de COX-2, telles que l'utilisation d'ARN d'interférence, afin de conclure quant à son rôle précis dans les maladies humaines.



Chapitre VI. L'autophagie

Le concept d'autophagie a été proposé dans les années 1960 par Christian de Duve lorsqu'il a mis en évidence un processus catabolique par lequel une cellule est capable de recycler son matériel cytoplasmique. La connaissance du phénomène est cependant restée limitée jusqu'aux travaux de Yoshinori Ohsumi (Prix Nobel de Médecine 2016) qui, au début des années 1990, a identifié les gènes de l'autophagie chez la levure pour ensuite démontrer que les mêmes mécanismes existaient chez l'Homme. Cette voie, alternative à celle du protéasome, conduit à la dégradation des organites et macromolécules cellulaires, par l'intermédiaire du lysosome. Les produits de cette dégradation lysosomale sont nécessaires à la synthèse de nouvelles macromolécules, utilisées comme source d'énergie pour la cellule. L'autophagie joue donc un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire.

VI.1. Les différentes formes d'autophagie

L'autophagie se compose de 4 différentes formes distinctes : la micro-autophagie, l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes, l'ADN/ARN autophagie et la macro-autophagie.

VI.1.1. La micro-autophagie

Le processus non sélectif de micro-autophagie peut être retrouvé chez tous les types cellulaires eucaryotes, en conditions de stress, telles que le jeûne et l'hypoxie. Cette forme d'autophagie se caractérise par la séquestration, par invagination de la membrane lysosomale, du contenu cytoplasmique, qui sera directement dégradé par le lysosome. La micro-autophagie joue un rôle dans la régulation de la composition des membranes lysosomales ou vacuolaires du fait de la dégradation de lipides incorporés dans les vésicules, le turnover des protéines membranaires, le maintien de la taille des organites cellulaires, mais aussi la survie cellulaire.

VI.1.2. L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes

Exclusivement sélective, l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes concerne seulement les macromolécules possédant le motif pentapeptidique KFERQ (soit près de 30% des protéines solubles cytosoliques et nucléaires). La reconnaissance spécifique de cette séquence par la protéine chaperonne Hsc70 permet la formation d'un complexe alors adressé à la membrane du lysosome. L'internalisation de celui-ci dans le lysosome est dépendante de la protéine transmembranaire LAMP-2A (Lysosomal-Associated Membrane Protein 2) qui, sous forme monomérique, joue le rôle de récepteur. En revanche, une fois sous forme multimérique, LAMP-2A va pouvoir assurer la translocation du complexe dans la lumière lysosomale où celui-ci va pouvoir se dissocier (159).

VI.1.3. L'ADN/ARN autophagie

Décrite en 2013, l'ADN et ARN autophagie est une nouvelle forme d'autophagie. Ce processus, ATP dépendant, permet la reconnaissance spécifique d'acides nucléiques présents dans le cytosol. Cette voie d'autophagie fait intervenir la protéine de la membrane lysosomale, LAMP-2C. Contrairement à l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes, l'ADN/ARN autophagie ne fait pas intervenir la protéine Hsc70. En effet, il s'agit d'une interaction directe des acides nucléiques avec



le récepteur LAMP-2C, conduisant à leur passage dans le lysosome, au sein duquel ils seront dégradés par des endonucléases et exonucléases spécifiques.

VI.1.4. La macro-autophagie

La macro-autophagie est, à ce jour, la forme d'autophagie la plus étudiée. C'est pourquoi le terme « autophagie » est souvent utilisé pour faire référence à cette macro-autophagie.

Cette dernière existe à un niveau basal et permet le maintien de l'homéostasie cellulaire en recyclant le contenu cytoplasmique. Cependant, en conditions de stress, telles que la carence en acides aminés ou en facteurs de croissance, l'hypoxie, le stress oxydatif et lors d'infections, l'autophagie est stimulée (160). Cette caractéristique est essentielle à la survie cellulaire le temps que les conditions cellulaires soient rétablies. L'implication d'une trentaine de gènes nommés les « Atg genes » (AuTophagy related genes) permet une régulation fine du processus autophagique. Ce dernier se compose de 3 étapes : l'initiation, l'élongation et la fusion de l'autophasome avec le lysosome.

VI.2. Les étapes de la macro-autophagie

VI.2.1. L'initiation

L'initiation du processus d'autophagie nécessite l'interaction de certaines protéines ATG dans le but de former une structure membranaire nommée PAS (Phagophore Assembly Site). L'origine des membranes du phagophore est aujourd'hui sujette à débat. En effet, différentes études ont montré que l'émergence de ces dernières a pour origine le réticulum endoplasmique, la membrane nucléaire, la mitochondrie, l'appareil de Golgi ou encore la membrane plasmique (161).

L'initiation de l'autophagie requiert un grand nombre d'acteurs regroupés en trois complexes qui interagissent entre eux afin de former le phagophore :

- le complexe MTORC1 (Mechanistic Target Of Rapamycin Complex 1) formé de la kinase mTOR (mammalian Target Of Rapamycin), de Raptor (Regulatory Associated Protein of mTOR), de mLST8 (mTOR associated protein LST8 homolo), de Deptor (DEP domain-containing mTOR-interacting protein) et de PRAS40 (Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa),
- le complexe ULK (UNC-51-Like Kinases) composé des protéines ULK1/2 (homologue d'ATG1), Atg13, FIP200 (FAK (Focal Adhesion Kinase) family Interacting Protein of 200 kDa) et Atg101,
- le complexe PI3K de classe III constitué de VPS34 (Vacuolar Protein Sorting 34), p150, Bécline-1, Atg14 et d'Ambra1 (Activating Molecule in Bécline-1 Related Autophagy protein 1).

En conditions normales, le complexe MTORC1 interagit avec ULK, afin d'assurer la stabilité de ce dernier, en phosphorylant les protéines ULK1/2 et Atg13. Atg13 serait un médiateur important de l'interaction entre ULK1/2 et FIP200 et permettrait ainsi d'augmenter l'activité kinase d'ULK1/2, également dépendante du statut de MTORC1. L'absence de source énergétique induit l'inhibition de MTORC1 et donc sa dissociation du complexe ULK. La protéine ULK1/2 peut alors phosphoryler la protéine Ambra1, un des composants du complexe PI3K, phosphorylation indispensable à l'interaction entre Ambra1 et Bécline-1. La formation du complexe PI3K permet la production de PI3P/PtdIns3P (Phosphatidylinositol-3-Phosphate), une molécule lipidique ayant la capacité de contrôler la biogenèse de l'autophagosome, ainsi que sa maturation en recrutant les protéines nécessaires à l'élongation du phagophore. Bien que le mécanisme d'action de PI3P demeure encore inconnu, il a été montré que la déplétion du pool de PI3P, par des phosphatases spécifiques, inhibe de façon drastique l'initiation de l'autophagie (**Figure I-58**).



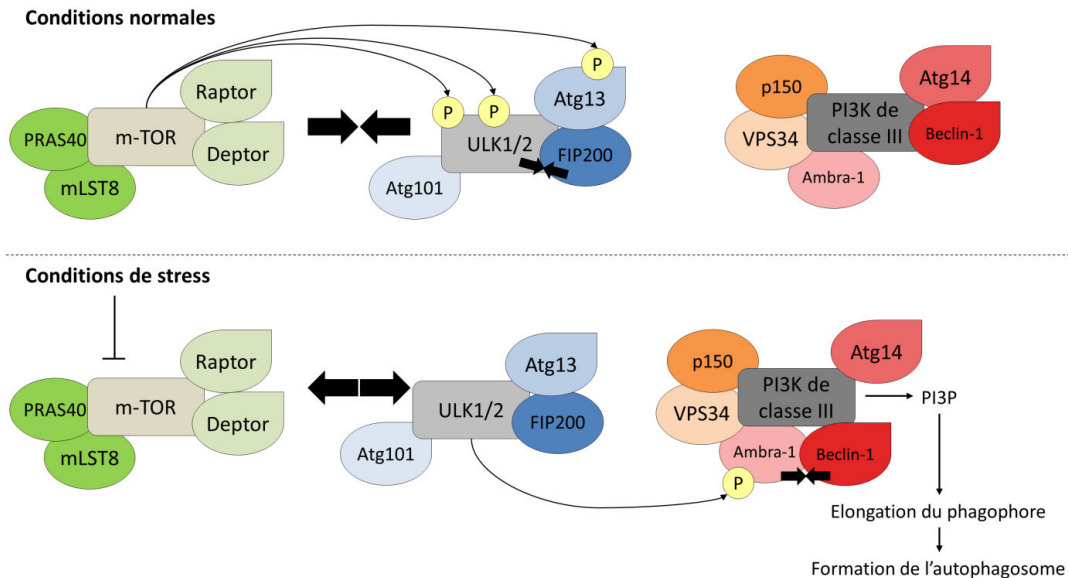


Figure I- 58 – L’initiation du processus de l’autophagie.

En conditions normales, MTORC1 interagit avec ULK en phosphorylant ULK1/2 et Atg13. Atg13 phosphorylée permet l’interaction de FIP200 avec ULK1/2. En conditions de stress, l’inhibition de MTORC1 permet à ULK1/2 de phosphoryler Ambra1, ce qui facilite l’interaction Ambra1/Bécline-1. La formation du complexe PI3K de classe III induit la formation de PI3P facilitant ainsi la formation de l’autophagosome.

VI.2.2. L’élargissement

Une fois le phagophore généré, il va s’allonger et s’incurver autour du contenu cytoplasmique à séquestrer. En effet, ces deux événements sont essentiels à la formation d’une structure close nommée autophagosome. Cette vésicule à double membrane isole « hermétiquement », du reste du contenu cellulaire, les macromolécules à dégrader. Cette étape d’élargissement de la membrane est régulée par deux systèmes de conjugaison, interdépendants, analogues aux systèmes d’ubiquitination des protéines, appelés « Ubiquitin-like conjugaison system ». Ces systèmes sont composés de trois classes de protéines : les enzymes activatrices E1, de conjugaison E2 et ubiquitines ligases E3 dont l’action va aboutir à la liaison d’un résidu glycine de l’ubiquitine à un résidu lysine d’une protéine (**Figure I-59**).

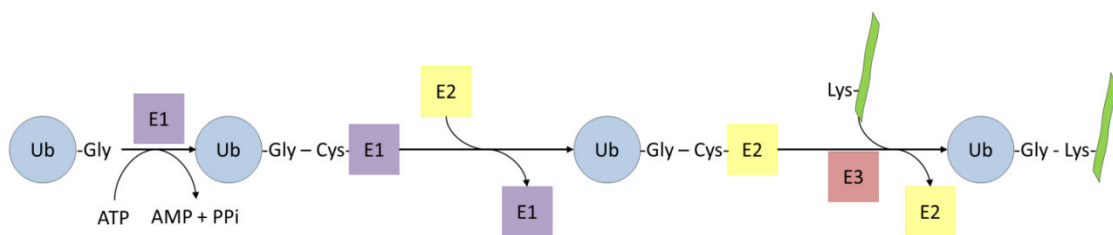


Figure I- 59 – Système d’ubiquitination d’une protéine.

Ce système est composé de trois classes de protéines : les enzymes activatrices E1, les enzymes de conjugaison E2, et les ubiquitines ligases E3.

Dans le cas des systèmes de conjugaison de l’élargissement, huit protéines de la famille Atg jouent le rôle des enzymes mettant en jeu huit protéines de la famille Atg qui permettent la formation de deux conjugués distincts : Atg12-Atg5 et LC3-PE (Light Chain 3 - Phosphatidyl-Ethanolamine).



VI.2.2.1. Le complexe d'élongation Atg12-Atg5

Dans ce premier système, la présence d'un résidu glycine, en C-Terminale, permet à Atg12 d'être directement activée par Atg7 (analogue à l'enzyme E1 du système d'ubiquitination). Cette activation, ATP-dépendante, entraîne le transfert d'Atg12 vers l'enzyme Atg10 (analogue à l'enzyme activatrice E2 du système d'ubiquitination). Enfin, la glycine C-Terminale d'Atg12 se lie, de façon covalente, à la lysine 149 de la protéine Atg5 libérant alors la protéine Atg10 afin de former le conjugué Atg12-Atg5. Aucune ligase E3 ne semble intervenir dans ce système.

La protéine Atg16L s'associe ensuite, de manière non covalente, à celui-ci afin de former un complexe macromoléculaire. Ce complexe Atg12-Atg5-Atg16 se situe sur la membrane externe du phagophore en élongation (**Figure I-60**).

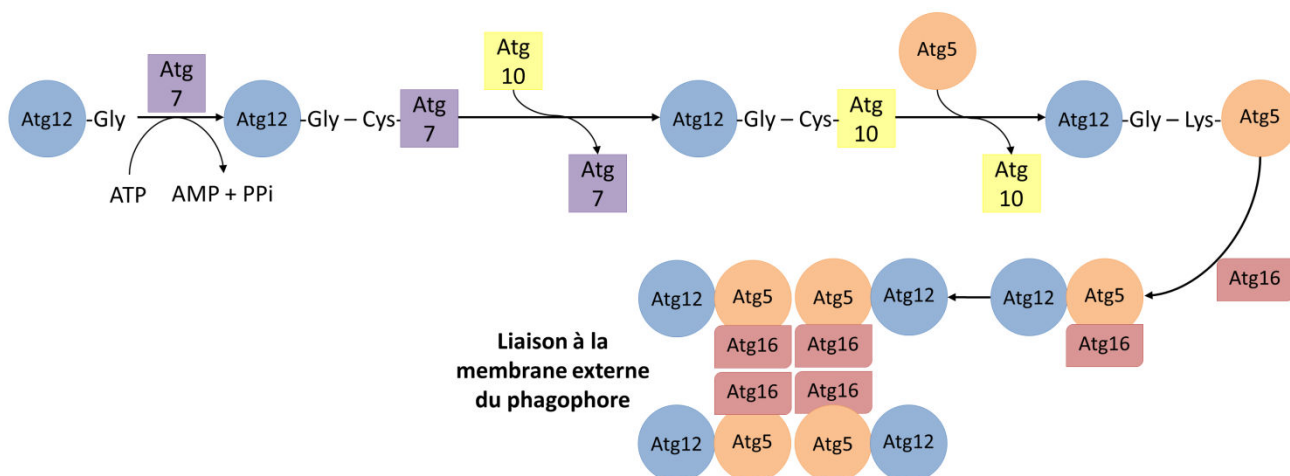


Figure I- 60 – Formation du complexe de conjugaison Atg12-Atg5.

La protéine Atg12, via un résidu glycine, est activée par Atg7 pour être ensuite transférée vers Atg10 et enfin se lie, de façon covalente, à la lysine 149 de la protéine Atg5. La protéine Atg16L s'associe enfin, de façon non covalente au complexe Atg12-Atg5. Ce complexe Atg12-Atg5-Atg16L se retrouve au niveau de la membrane externe du phagophore en élongation et se dissociera dès la fermeture de l'autophagosome.

VI.2.2.2. Le complexe d'élongation LC3-PE

Dans ce second système, à l'inverse d'Atg12, la protéine LC3A est initialement présente sous forme non mature appelée pro-LC3 et doit être maturée en LC3-I pour être ensuite activée. En effet, la protéase Atg4 clive la partie C-Terminale de LC3 afin d'exposer son résidu glycine 116 et permettre, par la suite, l'activation de LC3 par l'enzyme Atg7. Cette dernière est nécessaire au transfert vers la protéine Atg3. Enfin, la glycine 116 de LC3 est liée à un phospholipide membranaire : le phosphatidyl éthanolamine (PE), donnant naissance au conjugué LC3-PE ou LC3II.

Contrairement au complexe Atg12-Atg5-Atg16, LC3-II se distribue de manière équitable entre les membranes externes et internes du phagophore. De plus, ce complexe est primordial dans les dernières étapes de la formation de l'autophagosome (**Figure I-61**).



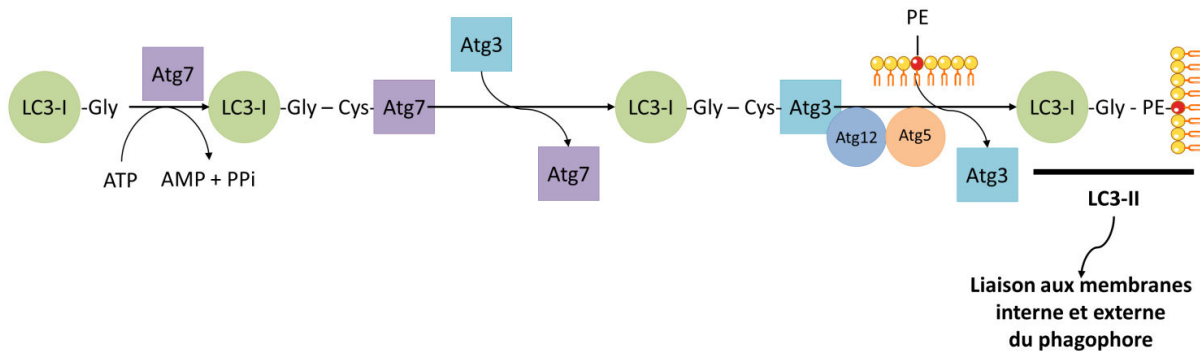


Figure I- 61 - Formation du complexe de conjugaison LC3-II.

LC3-I, par son résidu glycine 116 est activé par Atg7 pour ensuite être transférée vers Atg3 et se lier à un phospholipide membranaire : le phosphatidyl éthanolamine (PE), donnant naissance au conjugué LC3-PE ou LC3-II. Contrairement au complexe Atg12-Atg5-Atg16, LC3-II se distribue de manière équitable entre les membranes externes et internes du phagosome.

Enfin, le complexe Atg12-Atg5 se dissocie de la membrane externe de l'autophagosome dès sa fermeture alors que le complexe LC3-II intervenant dans la fermeture des membranes, ne se dissocie pas après la formation complète de l'autophagosome. En effet, LC3-II, située sur la surface interne, ne sera dégradée que lors de la fusion avec le lysosome. Ces caractéristiques font de LC3-II un marqueur de choix pour l'étude du flux autophagique (160). L'altération d'un seul des acteurs impliqués dans le processus de conjugaison suffit à abolir la genèse de l'autophagosome, démontrant l'importance de ces deux complexes dans le processus d'autophagie (**Figure I-62**).

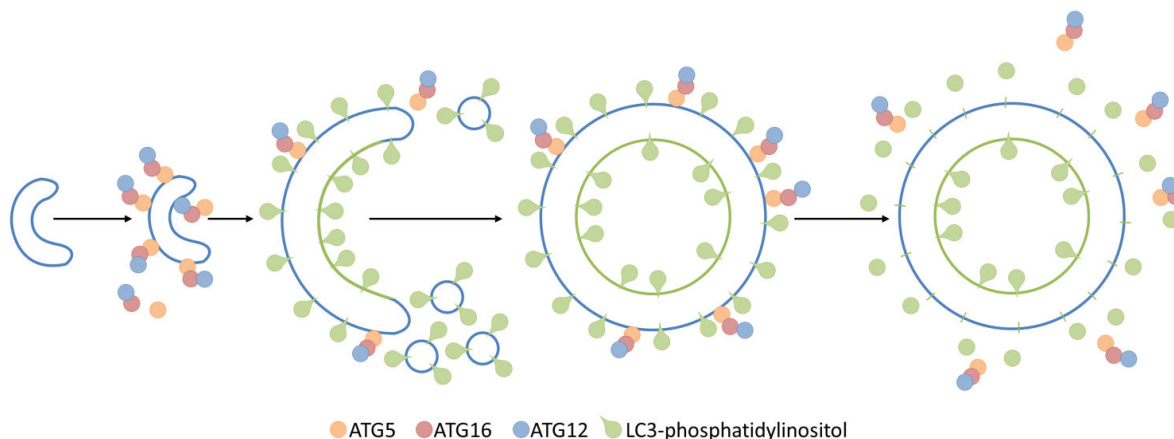


Figure I- 62 - La formation de l'autophagosome.

La formation de vésicules d'autophagie implique les systèmes de conjugaison d'Atg12-Atg5 et LC3-PE. L'initiation du phagophore est indépendante de la présence du conjugué Atg12-Atg5 et le complexe Atg12-Atg5-Atg16 est ensuite recruté sur cette structure. Atg12-Atg5-Atg16 est localisé à la surface extérieure du phagophore et est nécessaire au recrutement de LC3. La présence de LC3 sur le phagophore est nécessaire à son expansion. A l'issue de ce processus, le phagophore devient un autophagosome. Le complexe Atg12-Atg5-Atg16 se dissocie de cette vésicule et Atg4 libre, par son action protéolytique, le LC3 qui est présent sur la surface externe.

VI.2.3. La fusion de l'autophagosome avec le lysosome

L'autophagosome utilise les microtubules comme « rail directionnel » et le complexe dynéine-dynactine comme moteur moléculaire de leurs mouvements. La destination finale de l'autophagosome est la région cellulaire où se situe la majorité des lysosomes. Ainsi, cette co-localisation facilite la fusion de ces deux structures, afin de former l'autophagolysosome (ou autolysosome). Cependant, les autophagosomes peuvent d'abord fusionner avec les endosomes pour former des amphisomes, grâce aux protéines de la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting



Complex Required for Transport). Par la suite, les amphisomes fusionnent avec les lysosomes, nécessitant l'intervention de la machinerie Rab-SNARE (Soluble N-éthylmaleimide sensitive factor Attachment protein REceptor) couramment impliquée dans la fusion vésicule-vésicule.

Enfin, l'ultime étape de ce mécanisme d'autophagie est la dégradation du contenu de l'autophagosome. Cette dernière requiert la participation des hydrolases acides du lysosome, telles que :

- les lipases : elles génèrent des acides gras à partir de lipides.
- les protéases : elles dégradent les protéines en peptides, lysés ensuite par des peptidases en acides aminés.
- les nucléases : elles dégradent les acides nucléiques en nucléosides.

L'ensemble de ces produits de dégradation seront libérés dans le cytosol, grâce à des transporteurs lysosomaux, afin d'être réutilisés par la cellule.

VI.3. Les voies de régulation de l'autophagie

L'autophagie est un processus biologique complexe qui requiert d'être minutieusement régulé, afin de s'adapter aux conditions environnementales. En effet, l'autophagie est nécessaire au maintien de la survie cellulaire, à la fois en épurant la cellule d'organites endommagés, des métabolites toxiques, des pathogènes, mais également en maintenant les fonctions vitales en cas de carence énergétique. En revanche, l'autophagie peut également induire la mort cellulaire en cas d'autodigestion excessive ou de dégradation de constituants essentiels. Ce mécanisme doit donc être méticuleusement contrôlé par différentes voies de signalisation, dans le but de s'adapter à divers signaux cellulaires.

La plupart des régulateurs de l'autophagie sont soit des gènes suppresseurs de tumeurs, soit des protéines oncogènes, qui sont aussi des voies de signalisation impliquées dans la cancérogenèse. Ainsi, les gènes suppresseurs de tumeurs, tels que PTEN, AMPK, LKB1 et TSC1/2 régulent négativement mTOR et donc activent l'autophagie ; alors que les oncogènes tel que PI3K de classe I, Ras, Theb et Akt régulent positivement mTOR donc inhibent l'autophagie. De plus, l'interaction possible entre les protéines de la famille Bcl-2 et Bécline-1 constitue un lien fondamental entre les voies autophagiques et apoptotiques (**Figure I-63**).

VI.3.1. La voie mTOR

La voie majeure de régulation de l'autophagie est la signalisation mTOR, constituée des complexes MTORC1 et MTORC2. Comme dit précédemment, mTOR est un régulateur négatif de l'autophagie. En phosphorylant Atg13, mTOR empêche la formation correcte du complexe ULK, inhibant ainsi le processus d'autophagie (162). Généralement, MTORC1 est régulée par la quantité de nutriments, notamment d'acides aminés particuliers, tels que l'alanine, la leucine, la glutamine et la phénylalanine. Ainsi, l'état de jeun est associé à l'inhibition de la signalisation mTOR, induisant par conséquent l'autophagie. D'autre part, il a également été mis en évidence la capacité de la rapamycine à inhiber la fonction de mTOR, indépendamment de la concentration en acides aminés. Les régulateurs principaux de la signalisation mTOR sont : le système LKB1 (Liver Kinase B1)/AMPK (5' AMP-activated protein Kinase) et la voie de survie PI3K/Akt.



VI.3.1.1. Le système LKB1/AMPK

Avec les 2 sous-unités régulatrices STRAD et Mo25, LKB1 se retrouve au sein d'un complexe protéique capable de phosphoryler et donc d'activer une famille de 14 AMPK-related kinases. Les substrats de ces kinases sont impliqués dans la régulation de la polarité cellulaire, du métabolisme ou encore de la croissance cellulaire. L'AMPK, un des substrats de LKB1, est considéré comme le senseur énergétique principal de la cellule, en percevant le ratio ADP/ATP cytosolique. Ainsi, une diminution de ce ratio entraîne une phosphorylation activatrice de l'AMPK, par LKB1(163).

Le système LKB1/AMPK a la capacité d'induire l'autophagie en inhibant le complexe MTORC1 soit directement (en phosphorylant Raptor) soit par l'intermédiaire du complexe TSC1/2. La phosphorylation activatrice de TSC2 (Tuberous Sclerosis protein 2) induit à la stabilisation du complexe TSC1/2, qui agit en tant que GAP (GTPase Activating Protein) en inhibant Rheb (Ras Homolog Enriched in Brain), inactivant ainsi MTORC1 (164).

VI.3.1.2. La voie PI3K/Akt

La carcinogénèse est souvent associée à une activation constitutive de la croissance cellulaire due à des mutations activatrices d'acteurs de cette voie ou à la présence continue de facteurs de croissance, qui stimulent des récepteurs à activité tyrosine kinase, les RTKs. En réponse, ces derniers permettent l'induction des signalisations Ras et PI3K, qui convergent alors afin d'initier la voie mTOR. En effet, leur activation induit l'inhibition du complexe TSC1/2, par l'intermédiaire de la phosphorylation de la protéine Akt. Enfin, la voie PI3K/Akt, fréquemment retrouvée dérégulée dans la tumorigénèse humaine, est activatrice de la voie mTOR. Cet élément est le premier lien proposé faisant le parallèle entre autophagie et tumorigénèse.

VI.3.1.3. Le complexe Bécline-1/Bcl-2

L'interaction entre Bcl-2, molécule anti-apoptotique, et Bécline-1, protéine régulatrice de l'initiation du processus d'autophagie, constitue un lien entre les voies autophagiques et apoptotiques.

Les protéines de la famille Bcl-2 ont la capacité d'interagir avec la protéine Bécline-1, via leur domaine BH3, de la séquestrer et d'inhiber ainsi l'activité autophagique de Bécline-1 (165). En effet, la dissociation de ces deux protéines est indispensable à la formation du complexe PI3K de classe III, nécessaire à l'induction de l'autophagie. Cette séparation peut se faire de plusieurs façons.

En effet, pour occuper le domaine BH3 de Bcl-2, des protéines pro-apoptotiques, telles que BNIP3, Bad, Noxa, Puma, entrent en compétition avec Bécline-1 pouvant ainsi libérer Bécline-1 de Bcl-2.

Aussi, l'état de jeun peut induire la phosphorylation du domaine BH3 de Bcl-2, déstabilisant ainsi son interaction avec Bécline-1. Cette phosphorylation des sites T69, S70 et S87 de Bcl-2 est dépendante de l'activation JNK1 (c-Jun N-terminal protein Kinase 1).

De plus, en l'absence de nutriments ou sous un stress du réticulum, la protéine kinase DAPK (Death-Associated Protein Kinase) est capable d'induire la phosphorylation de la thréonine 119 localisée sur le domaine BH3 de Bécline-1. Cette kinase est considérée comme un gène suppresseur de tumeur, dont l'expression est inhibée dans plusieurs types de cancer humain (165).

Enfin, l'interaction de Bécline-1 avec d'autres protéines déstabilise ce complexe : le suppresseur de tumeur UVRAG (UV radiation Resistance-Associated Gene protein), dont l'interaction avec Bécline-1 promeut l'autophagie, la protéine Ambra1, qui induit la translocation de Bécline-1 vers le réticulum endoplasmique et initie par conséquent le processus d'autophagie, ou encore la protéine VPS34 interagit avec Bécline-1 afin de participer à la biogénèse et la maturation de l'autophagosome.



L'interaction Bcl-2-Bécline-1 constitue une preuve de l'interaction réciproque des voies de l'autophagie, de la survie et de la mort cellulaire.

VI.3.1.4. Le suppresseur de tumeur p53

Le suppresseur de tumeur p53 est généralement connu comme facteur de transcription en opérant dans le noyau. Toutefois, cette protéine agit également dans le cytoplasme en induisant la perméabilisation de la membrane mitochondriale et l'apoptose. Cette double fonction requière un transfert de p53 entre le cytoplasme et le noyau, permis grâce à l'existence d'un signal d'import et d'export nucléaire, dans sa queue C-Terminale.

Outre cette fonction apoptotique, la protéine p53 semble être un acteur clé dans la régulation de l'autophagie. En 2008, l'équipe de G. Kroemer démontre que cette dualité est dépendante de sa localisation subcellulaire. En effet, au niveau nucléaire, p53 agit en tant que facteur de transcription pro-autophagique, en inhibant notamment la transcription de gènes codant pour des protéines de la famille Bcl-2, alors que sa forme cytoplasmique inhibe le processus d'autophagie (166). Plus récemment, il a été montré, dans la lignée HCT116 (lignée de cancer colorectal humain), que la protéine p53 est capable de contrôler la balance autophagique en régulant négativement LC3 (167). p53 serait un régulateur post-transcriptionnel de LC3, cependant son mode d'action précis demeure inconnu. Deux fonctions sont alors envisageables, p53 pourrait favoriser la dégradation des ARNm matures de LC3 ou réguler des gènes codant pour des protéines de liaison à l'ARN. Cette fonction anti-autophagique de p53 est intéressante et nécessite d'autres investigations.

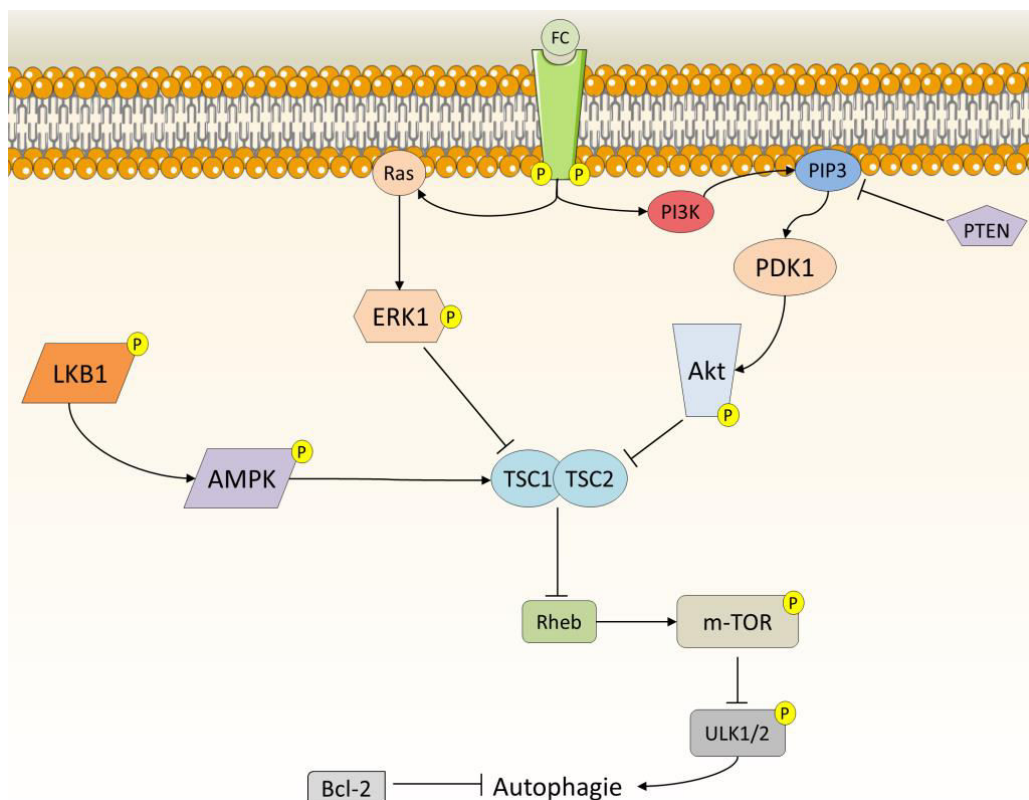


Figure I- 63 – Les régulateurs principaux de mTOR, l'inhibiteur principal de l'autophagie. La voie mTOR est régulé par le complexe TSC1/TSC2 lui-même régulé par la voie LKB1/AMPK, la voie ERK et la voie PI3K/Akt.



VI.4. L'implication de l'autophagie dans la cancérogenèse

Des dérégulations de l'autophagie s'illustrent régulièrement dans différentes pathologies, telles que les maladies neurodégénératives, l'infection par des pathogènes, le vieillissement ou le cancer (168). De plus, l'activité autophagique globale d'un individu diminue avec l'âge (169). Ce phénomène est inversement corrélé avec l'apparition des pathologies, précédemment citées. C'est notamment le cas du cancer, tel que le cancer de la prostate, dont l'un des premiers facteurs de risque est l'âge.

Durant cette dernière décennie, de nombreux travaux ont permis d'illustrer un lien étroit entre la régulation de l'autophagie et le processus tumoral (170). Les premières études comparatives du degré d'autophagie ont montré que les niveaux de protéolyse et de dégradation autophagique étaient plus faibles dans les cellules cancéreuses que dans les cellules saines (171). Cette découverte a illustré, pour la première fois, la relation étroite entre dérégulation de l'autophagie et mécanisme de tumorigenèse.

Par ailleurs, diverses mutations ont été identifiées dans l'ensemble de la voie PI3K-AKT-mTOR et cela dans la plupart des cancers (environ 30%). En effet, ces altérations se retrouvent aussi bien en amont, qu'en aval de cette voie, faisant de cette dernière la signalisation la plus dérégulée dans les cancers humains (172). Ces mutations sont responsables de l'activation non contrôlée de la signalisation mTOR, induisant une prolifération cellulaire accélérée et inhibant le processus d'autophagie.

Le gène suppresseur de tumeur PTEN (Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome Ten), code pour une phosphatase antagoniste de PI3K. De ce fait, PTEN prévient l'inhibition de l'autophagie par la voie PI3K-Akt-mTOR. Des mutations de PTEN sont fréquemment retrouvées dans de nombreux cancers humains, tels que le cancer du cerveau, du sein, de la prostate (173). Ces mutations sont associées à une inhibition de l'autophagie et participent à l'augmentation de la synthèse protéique, de la croissance et de la prolifération cellulaires (165).

D'autre part, le complexe TSC1/2 est largement connu pour son rôle de suppresseur de tumeur. En effet, il a été montré que des mutations de TSC1 ou TSC2 sont associées au développement d'une maladie autosomique dominante, la Sclérose Tubéreuse de Bourneville. Cette pathologie est associée au développement de tumeurs bénignes, dans divers tissus. De plus, ces mutations sont à l'origine de l'activation continue de MTORC1 (164) et donc de l'inhibition de l'autophagie.

Enfin, une délétion mono-allélique de Bécline-1 est retrouvée dans environ 40% des cancers de la prostate, 50% des cancers du sein et 75% des cancers des ovaires (174).

VI.5. Le paradoxe autophagie/cancer

En fonction du contexte cellulaire, l'autophagie peut agir en tant que suppresseur de tumeur en limitant la progression tumorale, mais également avoir un rôle pro-tumoral en favorisant la transformation oncogénique.

VI.5.1. L'autophagie, un suppresseur oncogénique

L'autophagie joue un rôle important dans le maintien de l'intégrité génomique des cellules cancéreuses et l'inflammation du site tumoral.

A l'état basal de la cellule, l'autophagie est requise pour éviter les événements qui pourraient conduire au développement tumoral. En effet, ce processus est essentiel à l'élimination d'éléments dont l'accumulation induirait la production de ROS à l'origine de dommages à l'ADN et d'instabilités génomiques, événements fortement retrouvés lors de l'initiation tumorale.



L'autophagie s'est révélée protectrice de l'intégrité génomique pour la première fois en 2007, dans les travaux de Mathew et White qui démontrent que la délétion d'Atg5 dans des cellules iBMK entraîne une augmentation du taux de mutation, une instabilité chromosomique, une activation importante de la réponse aux dommages à l'ADN et une aneuploïdie importante, marqueurs incontestables du développement tumoral (175). Ensuite, une délétion mosaïque du gène Atg5 ou une délétion du gène Atg7 hépatospécifique chez des souris, ont semblé conduire au développement de nombreux adénomes hépatiques, associés à l'accumulation de mitochondries gonflées, de stress oxydant et de dommages à l'ADN dans les hépatocytes. Enfin, Mortensen et al. ont démontré que la perte d'Atg7 dans les cellules souches hématopoïétiques entraîne effectivement une accumulation de mitochondries endommagées, de ROS, et de dommages à l'ADN accompagnés d'une hyper-prolifération (176). L'ensemble de ces données démontrent bien le rôle protecteur de l'intégrité génomique de l'autophagie.

De plus, l'autophagie peut exercer sa fonction d'inhibiteur de la croissance tumorale lors des premières étapes de la tumorigenèse. En effet, un état d'hypoxie et de stress métabolique associé à l'émergence de signaux nécrotiques peut induire une inflammation sur le site primaire de la tumeur. Ce processus se caractérise par une infiltration de cellules inflammatoires, notamment de macrophages sécrétant des cytokines, qui favorisent la croissance cellulaire afin de remplacer le tissu endommagé. En réponse à ces agressions, l'autophagie est stimulée dans le but de réduire la nécrose et donc l'inflammation, afin de protéger les cellules tumorales d'une hyper-prolifération. L'induction autophagique aura alors pour conséquence majeure le ralentissement de la progression tumorale (177).

L'ensemble de ces données témoigne de l'importance de l'autophagie dans la protection contre l'initiation tumorale.

VI.5.2. L'autophagie, un acteur pro-tumoral

Il a également été montré que l'autophagie promeut la résistance des cellules cancéreuses contre l'apoptose induite par des agents thérapeutiques anti-tumoraux. Bien que l'autophagie soit diminuée dans certaines cellules tumorales en comparaison aux cellules normales, l'inhibition de ce processus apparaît comme une cible thérapeutique de choix pour potentialiser l'effet des drogues anti-tumorales et ainsi sensibiliser les cellules cancéreuses aux signaux apoptotiques. Plusieurs études illustrent cette hypothèse.

Tout d'abord, l'inhibition de l'autophagie avec le 3-MA (3-méthyladénine) permet de potentialiser l'effet pro-apoptotique de mda-7 (Melanoma differentiation-associated gene 7) dans la lignée cancéreuse prostatique humaine DU 145 (178).

Ensuite, cette utilisation du 3-MA mais aussi la délétion du gène Atg7 permet d'amplifier l'effet pro-apoptotique de la drogue chimiothérapeutique 5-FU (5-fluorouracile) dans les cellules cancéreuses colorectales colon26 et HT-29 (179).

De plus, dans les travaux de Han sur les cellules de leucémie ou de cancer du côlon, résistantes à l'apoptose TRAIL dépendante, l'inhibition de l'autophagie rétablit la capacité de ces cellules à initier un programme de mort cellulaire (180).

Certaines cellules tumorales sont dites différenciées, celles-ci expriment des marqueurs cellulaires et moléculaires associés à leur état de différenciation. Alors que par opposition, d'autres cellules se trouvent à un stade immature et expriment des marqueurs spécifiques de cet état : on parle de cellules souches cancéreuses (CSC).



Une cellule tumorale est définie comme une cellule souche cancéreuse lorsqu'elle répond à deux critères fondamentaux : l'autorenouvellement (elle doit pouvoir reformer d'autres CSCs lors du processus de division cellulaire), la multi-potentialité (elle doit être capable de se différencier en chacun des composants cellulaires présents dans la tumeur ou l'organe dans lequel elle réside).

Les CSCs sont liées au développement tumoral, aux métastases et à la résistance thérapeutique, influençant donc directement le pronostic clinique. En effet, les CSCs semblent pouvoir être protégées contre les régimes chimio-thérapeutiques actuels, en expulsant les substances administrées (181).

Dans certaines CSCs, l'autophagie est inhibée en comparaison du reste de la tumeur. C'est notamment le cas des CSCs du cerveau, qui présentent une diminution de l'expression des protéines autophagiques et sont plus résistantes au traitement anticancéreux Temozolomide comparativement aux autres cellules cancéreuses du cerveau (182). Toutefois, d'autres études montrent, à l'inverse, que l'autophagie protège les CSCs des thérapies actuelles. Nous pouvons notamment citer l'exemple de la radiothérapie dans le traitement du gliome. Dans ce cas, les CSCs du gliome présentent une plus forte activité autophagique en comparaison des cellules tumorales non-CSCs. Par ailleurs, l'inhibition de l'autophagie, par traitement au 3-méthyladénine (3-MA) et à la bafilomycine A1, sensibilise ces CSCs aux rayons γ (183).

L'ensemble de ces données illustrent clairement le rôle pro-tumoral de l'autophagie, faisant de ce processus une cible intéressante dans le cadre de traitements thérapeutiques.

VI.6. Autophagie et photothérapie dynamique

Dans le cadre de la PDT, l'autophagie peut apparaître comme un processus qui précède et/ou fait suite et/ou est concomitant au phénomène d'apoptose. La cinétique du switch apoptose/autophagie dépend du type cellulaire, du type et de la concentration du photosensibilisateur mais également de la dose de lumière utilisés.

La PDT stimule l'autophagie préférentiellement par photooxydation/inactivation des régulateurs négatifs de cette voie autophagique tels que Bcl-2 et m-TOR, plutôt que par activation des effecteurs autophagiques tels que Bécline-1, Atg5 et Atg7. En effet, certains PS communément utilisés (BDP, Pc4) induisent des photo-dommages au niveau de Bcl-2 et/ou Bcl-xL, conduisant à la perte de leurs fonctions anti-apoptotiques et anti-autophagiques. Dans les cellules leucémiques de souris, le CPO stimule l'induction de l'autophagie en inhibant l'association Bcl-2/Bécline-1. En revanche, dans les cellules de cancer du sein MCF-7v déficientes en caspase-3 et les cellules de cancer de la prostate DU 145 déficientes pour la protéine Bax, la surexpression de Bcl-2 n'empêche pas l'autophagie induite par la photoactivation de la Pc4.

A l'inverse, certains PS agissent directement sur les acteurs de la voie autophagie. Le phéophorbide a est à l'origine d'une augmentation de l'expression des protéines Beclin 1, Atg5, Atg12 et Atg7 et également de la conversion de LC3-I en LC3-II dans la lignée cancéreuse prostatique humaine PC-3 (184). Le dérivé de benzoporphyrine (BPD), un PS mitochondrial, n'a aucun effet sur les effecteurs autophagiques tels que Bécline-1, Atg5 et Atg7 dans les cellules leucémiques de rat (L1210). Aussi, Bécline-1 et Atg5 ne subissent aucun effet dans les cellules HeLa ou MEFs photosensibilisées avec l'hypéricine.

Il a été démontré que les PS localisés au niveau du réticulum endoplasmique ou de la mitochondrie déclenchent une autophagie inductrice de la survie cellulaire par recyclage des organites endommagés ; à l'inverse, les PS localisés au niveau des lysosomes bloquent leur fusion avec l'autophagosome et sont donc inhibiteurs du processus autophagique (185).



Le nouveau PS synthétisé par Lihuan et al., la chlorophylline f, induit à la fois l'apoptose et l'autophagie dans les lignées de cancer de la vessie 5637 et T24 (186). Un prétraitement de ces cellules avec la 3-méthyl-adénine (3-MA), un inhibiteur de l'autophagie, augmente la sensibilité des cellules à la PDT et favorise l'induction du processus apoptotique. Dans ce modèle, l'autophagie apparaît comme inductrice d'une résistance à l'apoptose. L'effet maximal de ce PS s'exercerait donc via l'utilisation d'inhibiteur de l'autophagie.

Suite à un traitement par l'aloé-émodyne (AE), les cellules d'ostéosarcome humain MG-63 présentent des caractéristiques apoptotiques et autophagiques. L'inhibition de l'autophagie par la 3-MA ou la chloroquine (CQ) favorise l'apoptose induite par le PS. Dans ce modèle, l'autophagie joue donc un rôle protecteur contre l'apoptose. (187)

La chlorine e6 (Ce6) induit également ces deux voies de mort cellulaire dans la lignée cancéreuse colorectale humaine SW620. L'utilisation de la 3-MA ou de la bafilomycine A1 augmente les effets pro-apoptotiques du PS. L'autophagie est encore une fois inductrice d'une résistance au processus apoptotique (188).

Enfin, la PpIX induit une augmentation de l'expression des protéines Atg3, Atg5, Atg7 et Atg12 dans les cellules souches cancéreuses colorectales PROM1/CD133(+). L'inhibition de l'autophagie grâce à l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques ou grâce à un silencing d'Atg5 révèle le rôle protecteur de l'autophagie vis-à-vis de l'apoptose (189).

Dans les cellules HeLa, Panzarini et al. ont mis en évidence différents mécanismes de mort cellulaire tels que l'apoptose, l'autophagie et la nécrose suite à un traitement par le Rose Bengal, un PS préférentiellement localisé au niveau de l'appareil de Golgi ou du réticulum endoplasmique. Néanmoins, l'utilisation d'inhibiteurs de ces voies tels que des inhibiteurs des caspases (Z-LEHD-FMK, Z-IETD-FMK), de l'autophagie (3-MA) et de la nécrose (Nec-1), n'a aucun effet sur l'activation des autres voies de mort, ce qui signifie que celles-ci agissent toutes indépendamment (190).

Enfin, Kessel montre que l'utilisation de PS ciblant préférentiellement les lysosomes, tels que la Chlorine NPe6 et le palladium WST11, permet d'inhiber cette voie protectrice (191). En effet, une déficience en Atg7 et en Atg5 supprime l'autophagie. Ainsi, les PS localisés au niveau des lysosomes induisent des photo-dommages au niveau de ces protéines Atg permettant ainsi d'éviter le stress autophagique et de supprimer les fonctions protectrices de cette autophagie.

Ainsi, d'un point de vue moléculaire, les drogues anticancéreuses ont la capacité de moduler un ensemble varié de voies de signalisation. La recherche tend à développer des molécules capables d'induire le processus apoptotique dans les cellules cancéreuses mais également capables d'inhiber les voies de survie cellulaire et les voies de résistance à l'apoptose pouvant se mettre en place dans les cellules tumorales.



PROJET DE RECHERCHE

Le développement de nouvelles alternatives thérapeutiques permettant un traitement focal des lésions cancéreuses au sein de la prostate est aujourd'hui discuté. L'évolution des modalités de traitement des cancers d'autres organes (traitement de manière conservatrice et non plus radicale), les progrès technologiques (notamment en imagerie IRM) qui permettent d'envisager un traitement partiel de la glande à l'aide d'instruments adaptés et l'importance toujours plus grande accordée à la qualité de vie des patients sont, entre autres, des phénomènes ayant contribué de manière simultanée à l'élaboration de ce concept de thérapie focale en cancérologie prostatique. C'est dans ce contexte que la photothérapie dynamique (PDT), reposant sur le principe de la destruction des cellules tumorales tout en préservant les tissus sains avoisinants, est apparu comme un moyen thérapeutique intéressant dans le cadre du cancer de la prostate. La PDT repose sur l'administration d'un produit appelé photosensibilisateur (PS), capté par les cellules cancéreuses et qui, une fois activé par la lumière, est capable d'induire des réactions chimiques oxydatives à l'origine de la destruction de la tumeur.

Sur la base de la chimie verte, le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de Limoges tend à développer de nouveaux PS d'origine naturelle capables de cibler spécifiquement les cellules tumorales. C'est ainsi que le couplage de la protoporphyrine IX, un PS largement étudié, avec des polyamines a permis la synthèse de deux nouveaux PS : la protoporphyrine IX dispermidinée (PpIX-dSd) et la protoporphyrine IX disperminée (PpIX-dSm). Une caractérisation de ces PS avait permis de vérifier qu'ils répondaient à certaines caractéristiques attendues d'un PS idéal : une composition constante (idéalement pure et facilement synthétisable) et une absorption dans le rouge permettant de traiter des tumeurs plus profondes.

Ce projet de recherche s'inscrit dans la continuité de ce travail de synthèse et de caractérisation de ces nouveaux PS entrepris au sein du LCSN puisqu'il s'est intéressé à étudier leurs effets dans un modèle de cancer de la prostate.

Le but de nos travaux était d'évaluer à la fois *in vitro* et *in vivo* l'effet de ces nouveaux PS sur plusieurs lignées prostatiques.

Ainsi, *in vitro*, l'objectif était de démontrer :

- Que la pénétration des nouveaux PS dans les cellules était favorisée par la présence d'un PTS actif ;
- Que les nouveaux PS, après photoactivation, étaient au moins aussi efficaces en termes de ralentissement de la croissance des cellules tumorales et d'induction de l'apoptose que la PpIX seule ;
- Que l'efficacité des PS, après photoactivation, était comparable à celle de PS utilisés en thérapeutique, Photofrin® et 5-ALA ;
- Quel était l'impact des nouveaux PS sur la voie COX-2 et de vérifier s'il y avait alors modulation de l'efficacité du PS.

Enfin, *in vivo*, nous voulions étudier l'effet du traitement focal avec les nouveaux PS sur la croissance de tumeurs obtenues par xénogreffes des lignées prostatiques sur des souris immunodéprimées.



MATERIELS ET METHODES



I.1. Lignées cellulaires et culture

Les lignées cellulaires étudiées sont les lignées ovariennes de hamster CHO et CHO-MG, la lignée prostatique humaine saine RWPE-1 et les lignées cancéreuses prostatiques humaines PC-3, DU 145 et LNCaP. Les lignées CHO et CHO-MG proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC) et ont été gracieusement fournies par le Pr F. Gaboriau (Inserm U991, Rennes, France).

La lignée CHO a subi des mutations par utilisation de l'éthyl-méthanesulfonate et la résistance à l'action toxique de la méthylglyoxal-bis-guanyldrazone (MGBG) a permis d'isoler le clone CHO-MG. La MGBG est un agent antimétabolique et un inhibiteur de la S-adénosyl méthionine –décarboxylase (SAM-DC, une enzyme essentielle de la synthèse des polyamines. Il semble que la MGBG et les polyamines partagent le même système de transport. Une diminution du transport des polyamines est à l'origine de la résistance des clones à la MGBG : ils ne présentent pas d'altérations de la SAM-DC. Ainsi, la lignée CHO-MG est déficiente pour le système de transport des polyamines (PTS) (192). Ces deux lignées cellulaires sont cultivées dans du milieu RPMI1640 (GibcoRL) complété avec 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF, IDBio), une solution de pénicilline/streptomycine (100U/ml et 100µg/ml, GibcoBRL) et une solution de L-glutamine.

La lignée cellulaire RWPE-1 provient de l'ATCC. Elle provient de cellules épithéliales dérivées de la zone périphérique de la prostate d'un homme de 54 ans, qui ont été immortalisées par transfection avec une seule copie du virus du papillome humain 18 (HPV -18) (193). Cette lignée est mise en culture dans du milieu RPMI 1640 (GibcoBRL) complété avec de l'extrait d'hypophyse bovine (BPE – 0,05 mg/ml) et le facteur de croissance épidermique humain recombinant (EGF – 5 ng/ml).

Les lignées cancéreuses prostatiques androgéno-indépendantes, PC-3 et DU 145, proviennent respectivement d'une métastase osseuse d'un adénocarcinome prostatique de grade IV d'un homme de 62 ans (194) et d'une métastase cérébrale d'un carcinome prostatique d'un homme de 69 ans (195). La lignée cancéreuse prostatique androgéno-dépendante LNCaP a été isolée à partir d'une biopsie de ganglion lymphatique supraclaviculaire d'un homme de 50 ans avec un diagnostic confirmé de carcinome de la prostate métastatique (196). Ces 3 lignées cellulaires sont ensemencées en flacons de culture de 75 cm² dans du milieu RPMI 1640 (GibcoBRL) complété par 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF, IDBio), une solution de pénicilline/streptomycine (100U/ml et 100µg/ml, GibcoBRL) et une solution de L-glutamine.

Toutes les cellules sont cultivées en atmosphère humide (95 %) avec 5 % de CO₂ dans une étuve thermostatée à 37°C. Les numérations des cellules viables sont réalisées sur cellule de Malassez par le test d'exclusion au bleu trypan (Sigma) (les cellules blanches étant viables).

I.2. Obtention de lignées transfectées stables

Des ARN d'interférence shRNA dirigés contre COX-2 (OriGene Technologies) et des ADN complémentaires de COX-2 ont été respectivement transfectés dans les cellules PC-3 et les cellules DU 145 grâce à la Lipofectamine® 2000 (InvitroGen). Une lignée PC-3 F3 stable a été obtenue après transfection, dilution limite et sélection par antibiotique avec 0,5 mg/ml de puromycine (Sigma-Aldrich) et une lignée DU 145 D2 a été obtenue suite à la transfection, une dilution limite et une sélection par antibiotique avec 400 µg/ml de G418 (Sigma-Aldrich). Les variations de niveau d'expression de COX-2 ont été confirmées par western-blot.



I.3. Traitement et irradiation

Pour toutes les études réalisées, les cellules sontensemencées à une densité de 10^5 cellules/ml de milieu pour les cellules PC-3 et DU145 et à une densité de 2.10^5 cellules/ml de milieu pour les cellules CHO, CHO-MG, RWPE-1 et LNCaP. Les cellules prolifèrent pendant 24h afin d'atteindre leur phase exponentielle de croissance, phase à partir de laquelle les cellules sont traitées ou non par les PS contenus dans le milieu correspondant.

Les solutions mères des photosensibilisateurs tels que le Photofrin® (Pinnacle Biologics B.V) et le 5-ALA (Sigma Aldrich) ont été préparées dans du DMSO. La solution mère de protoporphyrine IX (Sigma Aldrich), de protoporphyrine IX dispermidinée (PpIX-dSd) et de protoporphyrine IX disperminée (PpIX-dSm) sont préparées, respectivement, dans du DMSO, une solution DMSO:eau (1:1) et dans l'eau puis diluées dans le milieu de culture correspondant pour obtenir les concentrations finales voulues. Les cellules témoins sont traitées par le même volume de solvant correspondant. Après 24h de traitement, le milieu est ensuite remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol afin que les cellules subissent ou non une irradiation par la lumière rouge (630 nm - PDT TP-1 de Cosmedico Medizintechnik GmbH, Schweningen, Allemagne) à une fluence de 75 J/cm^2 .

Lorsqu'un inhibiteur tel que le NS-398 ($10 \mu\text{M}$, Cayman Chemical) ou le SB203580 ($10 \mu\text{M}$, CalbioChem) est utilisé, il est ajouté 2h avant le PS.

I.4. Etude de la viabilité cellulaire

Le test au MTT (3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium bromide) est utilisé pour évaluer le nombre de cellules viables. Il est basé sur la transformation du MTT en cristaux bleus de formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Les cristaux de formazan formés sont solubilisés à l'aide de DMSO et sont ainsi détectables par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 550 nm. Ce test est utilisé pour comparer la croissance des cellules témoins à celle des cellules traitées par les PS photoactivés ou non.

Les cellules (CHO, CHO-MG, PC-3, DU 145, LNCaP et RWPE-1) sontensemencées en plaques 96 puits selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans $100 \mu\text{L}$ de milieu. Pour chaque condition analysée, 6 puits sont réalisés et ce 3 fois ($n=3$). Après 24h de croissance cellulaire, les cellules sont traitées avec les PS (PpIX seule ou polyaminée) pendant 24h. Le milieu est ensuite remplacé par $100\mu\text{L}$ de milieu dépourvu de rouge de phénol afin que les cellules subissent ou non une irradiation par la lumière blanche ou la lumière rouge (630 nm - PDT TP-1 de Cosmedico Medizintechnik GmbH, Schweningen, Allemagne) à une fluence de 75 J/cm^2 .

Pour chaque temps étudié, $10 \mu\text{L}$ de la solution de MTT (Sigma) (5 mg/mL , en tampon PBS) sont ajoutés dans chaque puits. Après 4 h d'incubation à 37°C en atmosphère humide, le milieu est éliminé et $100 \mu\text{L}$ de DMSO sont ajoutés par puits afin de lyser les cellules et de libérer les cristaux de formazan formés. L'absorbance est mesurée à 550 nm, par un lecteur de plaques ELISA (Multiskan EX, Labsystems). Les blancs de lecture correspondent à $100 \mu\text{L}$ de DMSO. Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle : $(\text{DO moyenne des cellules traitées} / \text{DO moyenne des cellules témoins}) \times 100 \pm \text{SEM}$.



I.5. Analyse du cycle cellulaire

Les cellules PC-3, DU 145 et LNCaP sont ensemencées en flacon de culture de 75 cm² à la densité déterminée. Après traitement par la PpIX-polyaminée (IC₅₀) et irradiation à la lumière rouge (75 J/cm²), les cellules sont récupérées, lavées au PBS 1X et un culot de 10⁶ cellules est constitué aux temps 24 et 48h. Le culot cellulaire est alors repris dans 300 µL de PBS 1X. Les cellules sont ensuite fixées par ajout de 700 µL d'éthanol 96%, vortexées et gardées minimum 24 h à -20°C. Les suspensions cellulaires sont ensuite centrifugées (1000 rpm, 10 min, TA) puis reprises dans 1 mL de PBS 1X. Un second lavage au PBS 1X est effectué puis le culot cellulaire est repris dans 500 µL de PBS 1X et 30 µL de RNase A et incubé 20 min à température ambiante. Une solution mère de RNase A à 100 mg/ml (Roche diagnostics, 40 U/mg) est préparée préalablement dans du tampon Tris (Tris-HCl 0,1 M pH 7,6 ; NaCl 0,1 M) ne contenant pas de DNase (la DNase résiduelle a été éliminée par chauffage à 100°C pendant 20 min).

Les cellules sont ensuite marquées à l'iodure de propidium (IP, 50 µg/ml) juste avant analyse par cytométrie en flux à l'aide d'un analyseur trieur FACSCalibur. Les résultats sont présentés sous forme de cytogrammes : pic du signal de fluorescence (FL3, fluorescence de l'IP) en fonction du nombre de cellules passées. Un minimum de 2x10⁴ cellules est analysé avec une vitesse de passage de 300 cellules/s. L'analyse de la distribution des cellules selon leur quantité en ADN (différentes phases du cycle cellulaire) est réalisée à partir des cytogrammes précédents avec le logiciel ModFit LT (Verity Software, USA).

I.6. Localisation des photosensibilisateurs

Les cellules cancéreuses prostatiques humaines (PC-3, DU 145 et LNCaP) sont ensemencées dans des labtecks selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans 300 µL de milieu. Les cellules sont ensuite traitées avec les PS (PpIX seule ou polyaminée) pendant 24 h soit à la même concentration (200 ng/mL) soit aux IC₅₀ déterminées. Les labtecks sont ensuite lavés 3 fois au PBS et du milieu dépourvu en rouge de phénol est ajouté. Dans certaines conditions, le CellLight® Lysosomes-GFP (ThermoFisher, 30 particules/ cellule) ou le MitoTracker Green® (Molecular Probes - 20 nM) sont ajoutés pendant respectivement 16h ou 30 min. Les labtecks sont de nouveau lavés au PBS. La localisation des PS est étudiée par microscopie confocale (PpIX : excitation 405 nm, émission 690 nm ; CellLight® Lysosomes-GFP : excitation : 490 nm, émission 516 nm ; Mitotracker Green® : excitation 490 nm, émission 516 nm) et des photographies sont prises grâce au microscope confocal (Laser Zeiss LSM 510 Meta – x200). L'intensité de fluorescence est déterminée grâce au logiciel de traitement d'images ImageJ.

I.7. Dosage du taux d'espèces oxygénées réactives

Les cellules cancéreuses prostatiques humaines (PC-3, DU 145 et LNCaP) sont ensemencées dans des plaques 96 puits à fonds transparents selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h. Les cellules sont ensuite traitées avec les PS (PpIX-dSd et PpIX-dSm) aux IC₅₀ déterminées et sont irradiées 24 h après à la lumière rouge (75 J/cm²). La production d'espèces oxygénées réactives (ROS) est alors quantifiée en utilisant le kit « DCFDA – Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay » (ABCAM) qui utilise le 2',7' – dichlorofluorescine diacétate (DCFDA). Après diffusion dans la cellule, le DCFDA est désacétylé par les estérases cellulaires en un composé non-fluorescent qui sera ensuite oxydé par les ROS en 2', 7' –dichlorofluorescéine (DCF). Le DCF est un composé fluorescent détectable par spectroscopie à fluorescence (excitation 485 nm ; émission 535 nm). Le Tert-Butyl Hydrogen Peroxide (TBHP) est utilisé comme contrôle positif.



I.8. Etude du potentiel membranaire mitochondrial

Le potentiel membranaire mitochondrial ou $\Delta\Psi_m$ est estimé en utilisant la sonde JC-1 (5,5',6,6'-tétrachloro-1,1',3,3'-tétraéthylbenzimidazole carbocyanide iodide, Molecular Probes). La sonde JC-1 est un composé qui existe sous forme de monomères fluorescents en vert lorsqu'il est à faible concentration et sous forme d'agrégats fluorescents en rouge à de fortes concentrations. La mitochondrie ayant un potentiel membranaire intact concentre JC-1 sous forme d'agrégats qui produisent une fluorescence rouge. Au contraire une mitochondrie ayant un potentiel altéré ne peut concentrer JC-1, les monomères produisent alors une fluorescence verte.

Les cellules PC-3, DU 145 et LNCaP sontensemencées à une densité de 10^5 cellules/ml dans des labtecks et prolifèrent pendant 24h avant d'être traitées ou non par la PpIX polyaminée photoactivée ou non par la lumière rouge. Au temps 24h, les cellules sont incubées dans du milieu contenant la sonde JC-1 (1 $\mu\text{g/mL}$) pendant 30 min à 37°C. Un lavage au PBS est ensuite effectué et les cellules sont remises dans une solution de PBS1X. Les photos ont été prises avec un microscope confocal laser Zeiss LSM 510 Meta (grossissement x200).

I.9. Analyse de l'expression de protéines

I.9.1. Extraction des protéines

Les cellules sontensemencées dans des flacons de culture de 75 cm^2 selon la densité déterminée auparavant. Après 24 h de prolifération, les cellules sont traitées ou non par la PpIX polyaminée pendant 24h. Le milieu est ensuite remplacé par du milieu dépourvu en rouge de phénol pour être irradié ou non. Aux temps 12, 24 et 48h, les cellules sont récupérées, centrifugées et lavées en tampon PBS 1X. Les culots cellulaires peuvent alors être congelés à -80°C si nécessaire.

I.9.1.1. Extraction des protéines totales

Les cellules sont lysées dans du tampon RIPA (HEPES 50 mM pH=7,5 ; Déoxycholate 1 % ; Nonidet P-40 1 % ; SDS 0,1 % ; NaCl 150 mM ; Aprotinine 20 $\mu\text{g/ml}$) contenant 40 $\mu\text{l/ml}$ d'une solution d'inhibiteurs de protéases (Complete®, Roche Diagnostics). Les lysats sont récupérés par centrifugation (12000 rpm, 20 min à 4°C) et placés dans la glace ou à -80°C avant de déterminer la concentration protéique par la technique colorimétrique de Bradford utilisant le bleu de Coomassie (Bio-Rad). La lecture au spectrophotomètre à 595 nm est effectuée contre une gamme étalon d'albumine sérique bovine (BSA : 0 à 2 mg/ml).

I.9.1.2. Extraction des protéines cytosoliques et membranaires

Le fractionnement subcellulaire est effectué suivant les instructions du kit d'extraction protéique « NE-PER™ Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents » (ThermoFisher Scientific).

Le culot cellulaire est repris dans 100 μL de CER I (Cytoplasmic Extraction Reagent I) froid, vortexé 15 s et incubé dans la glace pendant 10 min. 5,5 μL de CER II (Cytoplasmic Extraction Reagent II) froid sont alors ajoutés. Le tube est alors vortexé 5 s, incubé dans la glace pendant 1 min, vortexé de nouveau 5 s puis centrifugé 5 min à 16 000g. Le surnageant récupéré dans un nouveau tube contient les protéines cytoplasmiques alors que le culot est repris dans 50 μL de NER (Nuclear Extraction Reagent) froid. Ce culot est vortexé 15 s toutes les 10 min durant 40 min au total. Le tube est ensuite centrifugé 10 min à 16 000 g et le surnageant contenant les protéines nucléaires est alors récupéré dans un nouveau tube. Les échantillons protéiques cytoplasmiques et nucléaires sont



stockés à -80°C. Les concentrations protéiques de chaque fraction sont déterminées par la technique colorimétrique de Bradford contre une gamme étalon de BSA.

I.9.2. Expression des protéines

Les protéines (20 à 80 µg) sont mélangées à un volume identique de tampon d'échantillon 2X (Tris-HCl 50 mM pH 6,8 ; SDS 2 % ; Glycerol 10 % ; dithiothréitol 100 mM ; Bleu de Bromophénol 0,1 %), puis dénaturées 5 min à 95°C. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel d'électrophorèse dénaturant (SDS-PAGE) (8 à 15% selon les protéines). La migration s'effectue pendant 2h (90 V) dans le tampon de migration (Tris-HCl 25 mM pH 8,5 ; Glycine 250 mM ; SDS 0,1%). Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF (polyvinylidène difluoride) (Amersham Pharmacia Biotech) préalablement trempée quelques secondes dans du méthanol avant d'être rincée à l'eau puis équilibrée quelques minutes dans du tampon de transfert (Tris 48 mM ; Glycine 39 mM ; Méthanol 20 % ; SDS 0,03 % ; pH= 8,1-8,5). Le gel de polyacrylamide est également équilibré quelques minutes dans le tampon de transfert avant d'être mis en contact avec la membrane selon les instructions du fabricant (Invitrogen). Le transfert s'effectue pendant 1h30 (20V, 100 mA). Après lavages en tampon TBS 1X-Tween 0,1 %, la membrane est incubée pendant 1 h à température ambiante sous agitation avec du tampon de blocage (TBS 1X-Lait 4 % ou TBS 1X-BSA 5 %) afin de saturer les sites aspécifiques. Après avoir éliminé le tampon de blocage, les membranes sont lavées brièvement avant d'être incubées une nuit à 4°C sous agitation avec les anticorps primaires dilués dans le tampon de blocage.

Après incubation, les membranes sont lavées plusieurs fois dans du tampon TBS 1X-Tween 0,1% avant d'être incubées avec les anticorps secondaires polyclonaux anti-IgG correspondants conjugués à une peroxydase : anticorps secondaire anti-IgG de souris (1/5000, Dako) ou de lapin (1/10000, Cell Signaling). La révélation des complexes antigène-anticorps spécifiques se fait sous agitation douce 1h à température ambiante en présence de l'anticorps secondaire dilué dans le tampon de blocage. Les membranes sont ensuite lavées dans le tampon de lavage afin d'éliminer l'excès d'anticorps secondaire.

La révélation est réalisée par une réaction de chimiluminescence en utilisant le système Immobilon (Substrat HRP Immobilon Western, Merck Millipore) et le système G:BOX (Syngene, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France).

Le poids moléculaire des bandes spécifiques ainsi révélées est déterminé grâce à la migration de marqueurs de poids moléculaires connus (PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, Thermo Scientific). L'intensité relative des bandes est déterminée grâce au logiciel GeneSys (Syngene).



Les anticorps monoclonaux de souris ou de lapin sont dirigés contre différentes protéines humaines :

Protéine	Source	Dilution	Fournisseur
Cycline E	Souris	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Cycline A	Souris	1/200	Santa Cruz Biotechnology
CDK1	Souris	1/200	Santa Cruz Biotechnology
CDK2	Souris	1/200	Santa Cruz Biotechnology
p53	Souris	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Phospho-p53	Souris	1/200	Santa Cruz Biotechnology
p21	Souris	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Caspase 9	Souris	1/1000	Cell Signaling
PARP-1	Souris	1/1000	Cell Signaling
Bcl-2	Souris	1/200	Santa Cruz Biotechnology
Phospho-Akt (ser473)	Lapin	1/1000	Cell Signaling
Phospho-Akt (thr308)	Lapin	1/1000	Santa Cruz Biotechnology
COX-2	Souris	1/1000	Cayman
Bécline-1	Lapin	1/1000	Cell Signaling
ATG (5, 12, 16L, 7, 3)	Lapin	1/1000	Cell Signaling
LC3-I, LC3-II	Lapin	1/1000	Cell Signaling
mTOR	Lapin	1/1000	Cell Signaling
Phospho-mTOR	Lapin	1/1000	Cell Signaling
AMPK	Lapin	1/1000	Cell Signaling
Phospho-AMPK	Lapin	1/1000	Cell Signaling
TSC2	Lapin	1/1000	Cell Signaling
Phospho-TSC2	Lapin	1/1000	Cell Signaling
β -actine	Souris	1/10000	Sigma



I.10. Analyse de l'activation de la caspase-3

Le dosage de la quantité de caspase-3 active se fait à partir du kit « Quantikine® Human active caspase-3 » (R&D Systems). Ce kit ELISA est basé sur l'utilisation d'un inhibiteur de caspase biotinylé, la biotine-ZVKD-fmk. L'inhibiteur rentre dans les cellules et interagit avec la grande sous-unité de la caspase-3. Cette interaction se fait par la création d'un pont de type thio-ester stable entre l'inhibiteur et la cystéine du site catalytique de la caspase-3. Seules les caspase-3 actives sont ainsi modifiées car les formes inactives n'interagissent pas avec l'inhibiteur.

Les cellules sontensemencées dans des flacons de culture de 75 cm² selon la densité déterminée auparavant. Après 24 h de prolifération, les cellules sont traitées ou non par la PpIX polyaminée pendant 24h. Le milieu est ensuite remplacé par du milieu dépourvu en rouge de phénol pour être irradié ou non. Les cellules sont incubées pendant 1h à 37°C avec 10 µM de l'inhibiteur biotine-ZVKD-fmk dans du milieu de culture. Les cellules sont ensuite récupérées, rincées au PBS 1X et lysées dans du tampon d'extraction complété par des inhibiteurs de protéases [leupeptine (25 µg/ml) ; pepstatine (25 µg/ml) ; PMSF (100 µM) ; aprotinine (3 µg/ml)].

Les essais sont réalisés en plaque de 96 puits recouverts d'un anticorps monoclonal dirigé contre la caspase-3. Les échantillons sont dilués 20 fois et 100 µL sont déposés dans la plaque. En parallèle, une gamme étalon est préparée avec de la caspase-3 recombinante couplée à de la biotine.

La plaque est incubée 2h à température ambiante. La plaque est ensuite lavée afin d'éliminer tout ce qui n'a pas été retenu par l'anticorps anti-caspase-3, puis 100 µL d'une solution de streptavidine-HRP (horseradish peroxydase) sont ajoutés. La plaque est alors incubée 1h à température ambiante et la streptavidine se fixe sur la biotine portée par l'inhibiteur lui-même fixé aux caspase-3 actives. La plaque est ensuite lavée afin d'éliminer la streptavidine-HRP qui ne s'est pas fixée.

Enfin, une solution contenant le substrat de la HRP et une substance chromogène sont rajoutées. Au cours de l'incubation de 30 min à l'obscurité et à température ambiante, il se développe une réaction colorée qui est proportionnelle à la quantité de caspase-3 active présente. La réaction est stoppée au bout des 30 min par l'adjonction d'une solution d'acide chlorhydrique et la densité optique est déterminée à 450 nm contre une longueur d'onde de correction de 540 nm.

La quantité de caspase-3 active dans les échantillons est alors déterminée par rapport à la gamme étalon de caspase-3 recombinante couplée à la biotine.

I.11. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN

Les cellules PC-3, DU 145, LNCaP et RWPE-1 sontensemencées en flacon de culture de 75 cm² à la densité déterminée. Après traitement par la PpIX-polyaminée et irradiation, les cellules sont récupérées, lavées au PBS 1X et un culot de 10⁵ cellules est constitué aux temps 24 et 48h. Le culot cellulaire est alors repris dans du tampon de lyse (4 ml/10⁶ cellules) et incubé 30 min à température ambiante. La fragmentation de l'ADN est alors quantifiée par le kit « Cell Death Detection ELISA^{PLUS} » (Roche Diagnostics). Après centrifugation (10 min à 200 g), les lysats cellulaires sont déposés dans les puits d'une plaque d'analyse recouverts de streptavidine. Un mélange d'anticorps anti-histones biotinylés et d'anticorps anti-ADN conjugués à la peroxydase est ensuite ajouté dans les puits. Au cours de l'incubation (2 h sous agitation), les mono- et les oligo-nucléosomes formés lors de la fragmentation de l'ADN sont complexés avec les anticorps anti-histones, eux-mêmes capturés au fond des puits par la streptavidine. De plus, les anticorps anti-ADN réagissent avec l'ADN nucléosomique. Après lavages, une solution d'ABTS (2,2'-azino-di-[3-éthylbenzothiazoline sulfonate]), substrat de la peroxydase, est ajoutée dans les puits.



Au cours de l'incubation (15 min sous agitation à température ambiante), une réaction colorimétrique se développe entre l'ABTS et la peroxydase portée par les anticorps anti-ADN. La quantité d'ABTS oxydé correspondant à la quantité d'ADN fragmenté est mesurée à 405 nm à l'aide d'un lecteur de plaque ELISA. Le blanc de lecture est représenté par la solution d'ABTS (longueur d'onde de référence 490 nm). Chaque condition est testée trois fois et les valeurs moyennes d'absorbance (405 nm - 490 nm) sont ensuite déterminées pour chaque échantillon et comparées aux valeurs obtenues pour les contrôles cellulaires (cellules non traitées).

I.12. Analyse de l'activation des MAP Kinases

Les cellules PC-3 et DU 145 sontensemencées en flacon de culture de 75 cm² à la densité déterminée. Après traitement par la PpIX-polyaminée et irradiation, les cellules sont récupérées, lavées au PBS 1X et un culot de 10⁶ cellules est constitué aux temps 5min, 20min, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h et 48h. Les cellules sont ensuite homogénéisées dans du tampon de lyse contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases conformément au protocole du fabricant (R&D Systems). Les lysats cellulaires sont ensuite centrifugés à 2000g pendant 5 min, puis les surnageants ont été dilués six fois. La détection de phospho-p38 α (Thr 180/Tyr 182) a été réalisée selon les instructions du fabricant (R&D Systems).

Avant l'expérience, une plaque 96 puits a été recouverte avec 100 μ l par puits d'anticorps spécifiques de p38 (4 μ g/ml) pendant la nuit à température ambiante. Cet anticorps lie la protéine non phosphorylée et phosphorylée. Après trois lavages (400 μ l/puits de tampon de lavage) et blocage en PBS/BSA 1% (300 μ l/puits) pendant 1-2h à température ambiante, 100 μ l d'échantillons dilués sont ajoutés dans chaque puits et incubés 2h à température ambiante. Une gamme étalon est préparée avec p38 phosphorylée. Après lavages, un anticorps biotinylé spécifique de la forme phosphorylée de p38 est rajouté dans les puits. Après 2h d'incubation, une solution de streptavidine couplée à une peroxydase (HRP) est ajoutée dans chaque puits pendant 20 min. Après lavages, 100 μ l d'une solution contenant le substrat de la HRP et une substance chromogène sont rajoutés. Au cours de l'incubation de 20 min à l'obscurité et à température ambiante, il se développe une réaction colorée qui est proportionnelle à la quantité de MAPK phosphorylée présente. La réaction est stoppée au bout des 20 min par l'adjonction d'une solution d'acide sulfurique 2N et la densité optique est déterminée à 450 nm contre une longueur d'onde de correction de 540 nm. La quantité de MAPK phosphorylée présente dans les échantillons est alors calculée en fonction de la gamme étalon préparée.

I.13. Analyse de retard sur gel

L'analyse du retard sur gel a été réalisée grâce à un kit « DIG GEL SHIFT » (Roche Diagnostics). Une quantité de 10 μ g de protéines nucléaires sont incubées pendant 15 min à température ambiante avec une sonde spécifique de NF κ B marquée par de la digoxigénine en accord avec les instructions du fabricant.

Les échantillons sont ensuite déposés sur un gel de polyacrylamide 5% et les protéines nucléaires et les complexes protéines-sonde sont séparés par électrophorèse en conditions natives et la migration se fait à 80 V pendant 1h30 dans du tampon TBE 0,5X (Tris-Borate-EDTA).

Les protéines nucléaires et les complexes protéines-oligonucléotides sont ensuite transférés sur une membrane en nylon (Roche). La membrane est ensuite séchée et fixée par exposition aux UV pendant 3 min.



La membrane est alors incubée dans une solution de blocage pendant 30 min puis incubée pendant 30 min en présence d'un anticorps polyclonal de chèvre antidigoxigénine couplé à une phosphatase alcaline.

La révélation se fait par incubation de la membrane dans un réactif de chimiluminescence CSPD® grâce au système G :BOX (Syngene, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France).

I.14. Dosage du taux de prostaglandine E₂

Le kit « Prostaglandin E₂-monoclonal enzyme immuno assay » (Cayman Chemical) permet de mesurer la production au cours du traitement de PGE₂ synthétisée par les cyclooxygénases cellulaires à partir du métabolisme oxydatif de l'acide arachidonique.

Les cellules PC-3 et DU 145 sontensemencées en flacon de culture de 75 cm² à la densité déterminée. Après traitement par la PpIX-polyaminée et irradiation, le surnageant de culture est recueilli aux temps 24 et 48h puis utilisé pour le dosage ou peut être congelé à -80°C jusqu'à utilisation.

Le nombre de cellules présentes dans le milieu est estimé par numération au bleu trypan sur cellule de Mallassez afin de ramener la production de PGE₂ au nombre de cellules vivantes.

Le dosage est basé sur le principe de compétition entre la PGE₂ cellulaire libre présente dans l'échantillon et une PGE₂ conjuguée à l'acétylcholinestérase (traceur) introduite en quantité connue dans le milieu réactionnel. Ces deux fractions entrent en compétition pour la liaison avec un anticorps anti-PGE₂ de souris. La quantité de traceur capable de se fixer à l'anticorps anti-PGE₂ est inversement proportionnelle à la concentration de PGE₂ dans les échantillons. Les complexes anticorps-PGE₂ (cellulaire ou traceur) se lient également à des anticorps anti-souris de chèvre fixés dans chaque puits de la plaque 96 puits. Pour chaque dosage, la plaque EIA doit comporter 2 blancs (réactif de Ellman seul) permettant de mesurer le bruit de fond, 2 puits « Non Specific Binding », (tampon EIA, traceur, réactif de Ellman) permettent d'évaluer la liaison non spécifique du traceur, 2 puits B₀ (tampon EIA, traceur, anticorps anti-PGE₂, réactif de Ellman) permettent de mesurer la liaison maximale du traceur en présence d'anticorps anti-PGE₂ et 2 puits « Total Activity » (traceur, réactif de Ellman) permettent de mesurer l'activité du traceur sans compétition.

Une gamme standard de PGE₂ allant de 0 à 1 ng/ml est également préparée. La gamme et les échantillons sont alors introduits dans les puits, le traceur et l'anticorps anti-PGE₂ sont ensuite ajoutés.

Après incubation 18h à 4°C, la plaque est vidée et lavée 5 fois pour éliminer tout ce qui n'a pas été fixé. Afin de déterminer la quantité de traceur fixé, le réactif d'Ellman contenant le substrat de l'acétylcholinestérase est ajouté à chaque puits. Après incubation (60 min à température ambiante, à l'obscurité et sous agitation), le produit de la réaction enzymatique est coloré (jaune) et est donc détectable par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 405 nm.

L'absorbance ainsi obtenue est proportionnelle à la quantité de traceur fixé et inversement proportionnelle à la quantité de PGE₂ présente dans nos échantillons. La concentration de l'échantillon en PGE₂ est déterminée contre la gamme standard de PGE₂ allant de 0 à 1 ng/ml.

Les résultats sont exprimés en quantité de PGE₂ par ml (pg/ml) rapportée au nombre de cellules viables présentes dans les puits (pg/ml/10⁶ cellules). La concentration de PGE₂ est obtenue en tenant compte des valeurs d'absorbance des blancs et en utilisant la courbe de référence d'équation : $\text{standard}/B_0 = f([\text{PGE}_2])$.



I.15. Statistiques

Les analyses statistiques de différences entre les résultats concernant les cellules traitées et les cellules témoins ont été réalisées par des analyses de test de Student. Une valeur de P inférieure à 0,05 ($P < 0,05$) est considérée comme significative. Toutes les expériences ont été réalisées trois fois.



Chapitre II. Expérimentations *in vivo*

Les expérimentations *in vivo* de cette étude reposent sur les xénogreffes de cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3 à des souris immunodéprimées âgées de 5 semaines.

II.1. Xénogreffes de cellules cancéreuses prostatiques humaines, traitement et irradiation

La lignée cancéreuse prostatique humaine PC-3 estensemencée en flacons de culture de 175 cm² dans du milieu RPMI 1640 (GibcoBRL) complétement par 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF, IDBio) et une solution de pénicilline/streptomycine (100U/ml et 100µg/ml, GibcoBRL). Les cellules sont cultivées en atmosphère humide (95 %) avec 5 % de CO₂ dans une étuve thermostatée à 37°C. La numération des cellules viables est réalisée sur cellule de Malassez par le test d'exclusion au bleu trypan (Sigma) (les cellules blanches étant viables) et les cellules sont remises en suspension dans du PBS 1X. Afin de faciliter la prise des tumeurs au niveau des souris, cette suspension cellulaire est mélangée à du matrigel® (Corning® Matrigel® Matrix).

L'anesthésie des souris nudes BALB/c nu/nu est effectuée avec un mélange de Kétamine (16 mg/mL) et de Rompun (0,8 mg/mL) dilué dans du sérum physiologique et injecté dans le péritoine des souris.

Suite à l'anesthésie des souris, le mélange suspension cellulaire/matrigel® (1 :1) est injecté en position sous-cutanée de chaque côté de la région dorsale des souris. Ainsi, chaque souris porte deux tumeurs composées chacune de 5.10⁶ cellules PC-3. La croissance tumorale est vérifiée par mesure des tumeurs à l'aide d'un pied à coulisse.

Une fois que les tumeurs ont atteint un volume de l'ordre de 120 mm³, les souris sont de nouveau anesthésiées et pesées afin d'être divisées en 4 groupes : témoins, PpIX, PpIX-dSd et PpIX-dSm. Les souris reçoivent une injection de 10 mg/kg de PS au niveau de la veine de la queue.

Après 24h, les irradiations des tumeurs sont réalisées sur les souris maintenues sous anesthésie. Elles sont effectuées à l'aide d'un laser rouge H-séries 660 nm (EdmundOptics). Son faisceau de 7 mm de diamètre atteint les tumeurs avec une puissance de 100 mW. Ainsi, une seule des deux tumeurs de chaque souris est soumise à deux séquences de 5 min d'irradiation par la lumière rouge. Les souris témoins reçoivent uniquement l'irradiation sans administration d'un autre produit.

II.2. Etude de la croissance tumorale

Pour cette étude, les volumes tumoraux sont mesurés du jour 0 (jour de l'irradiation) au jour 21 à l'aide d'un pied à coulisse afin d'étudier la croissance des tumeurs selon les conditions. Au jour 21, les souris sont sacrifiées et les tumeurs récupérées et photographiées afin de comparer les volumes des tumeurs selon les conditions étudiées.

II.3. Inclusion des tumeurs en paraffine

Les tumeurs récupérées sont fixées dans du formol (10%) avant de subir des cycles de déshydratation et être incluses en paraffine (Département d'anatomopathologie, CHU, Limoges). Des coupes sont effectuées à l'aide d'un microtome afin d'effectuer des analyses histologiques (HES) et immunohistologiques.



II.4. Colorations et marquages immuno-histologiques des coupes tumorales

Les coupes tumorales sont soumises à une coloration hématoxyline-éosine-safran (HES) et à un marquage au Ki-67 afin d'étudier respectivement la structure/morphologie et la prolifération des cellules composant la tumeur. Une étude immuno-histologique dirigée contre la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est également effectuée afin d'évaluer son niveau d'expression et donc l'éventuelle induction du processus apoptotique au sein des différentes tumeurs. L'ensemble de ces marquages est effectué par le service d'Anatomopathologie du CHU de Limoges.

Les coupes sont ensuite observées par microscopie et des prises de vue sont effectuées sur différentes zones de la tumeur afin d'avoir une vue d'ensemble de celle-ci.



PARTIE EXPERIMENTALE



I.1. Protoporphyrine IX polyaminée et viabilité cellulaire

Les différentes lignées cellulaires sontensemencées à 10^5 cellules/ml de milieu de culture frais. Après 24h de prolifération, les cellules sont traitées ou non (témoin) par une gamme de concentrations de PS allant de 5 à 200 ng/mL. Après 24h en présence du PS (PpIX seule ou polyaminée), le milieu de culture est remplacé par du milieu dépourvu en rouge de phénol afin que les cellules soient sujettes à une irradiation (lumière blanche ou lumière rouge – 75 J/cm^2). La lumière rouge étant la plus pénétrante au sein des tissus, il est apparu important d'étudier les effets de nos PS photoactivés à 635 nm en vue de futures applications en clinique. Néanmoins, il a semblé pertinent d'étudier également les effets des PS, cette-fois ci, photoactivés par la lumière blanche, afin d'utiliser l'ensemble des pics d'absorption de la PpIX.

La viabilité des cellules traitées est alors suivie par le test au MTT pendant 48h et rapportée à la viabilité des cellules témoins qui est suivie de la même manière.

Les IC_{50} (concentration de PS nécessaire pour obtenir une réduction de 50% de la viabilité cellulaire) sont ensuite calculées, en vue de comparer l'effet des différents PS en fonction de la présence ou non de polyamines, et en fonction de la lignée cellulaire étudiée.



I.1.1. Effets de la PpIX seule et polyaminée sur la viabilité cellulaire de lignées cellulaires ovariennes de hamster CHO et CHO-MG

Dans ces 2 lignées, les 3 PS n'ont aucun effet sur la viabilité cellulaire. En cas de photoactivation par la lumière rouge ou la lumière blanche, la PpIX seule présente très peu d'effets sur la viabilité cellulaire. Cependant, une fois couplée aux polyamines (PpIX-dSd et PpIX-dSm), la PpIX photoactivée exerce un effet dose-dépendant sur la viabilité cellulaire (**Figure R-1**).

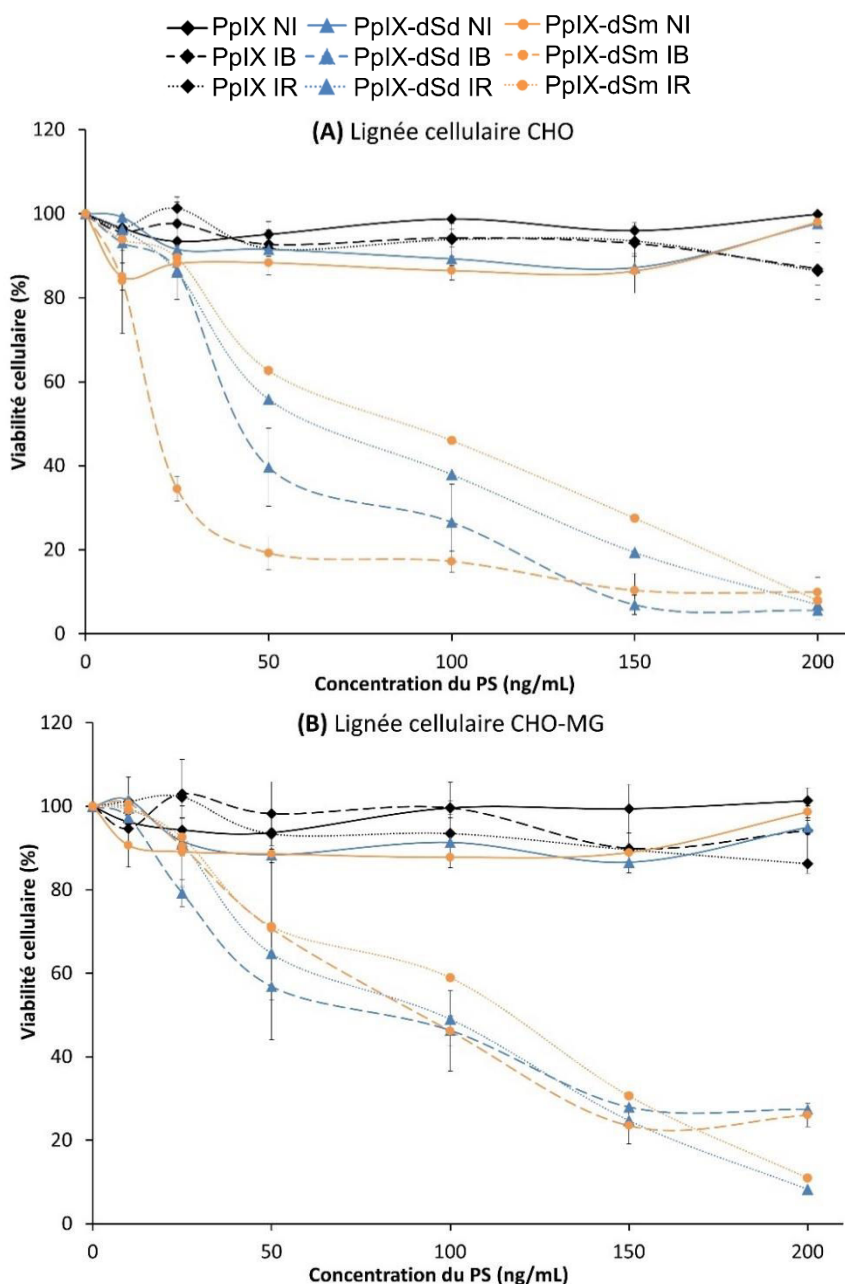


Figure R- 1– Effets des photosensibilisateurs sur la viabilité des lignées cellulaires CHO et CHO-MG. PpIX : Protoporphyrine IX, PpIX-dSd : protoporphyrine IX dispermidinée, PpIX-dSm : protoporphyrine IX disperminée, NI : non irradiées, IR : irradiation rouge, IB : irradiation blanche)

Les IC₅₀ ont été calculées :

IC ₅₀ (ng/mL)	Lumière rouge		Lumière blanche	
	CHO	CHO-MG	CHO	CHO-MG
PpIX	787 ± 10	785 ± 5	>200	>200
PpIX-dSd	56 ± 2	92 ± 3	46 ± 3	70 ± 2
PpIX-dSm	81 ± 2	111 ± 2	33 ± 2	90 ± 3



Ces premiers résultats montrent que, dans les 2 lignées, les PS seuls, sans irradiation blanche ou rouge, n'ont aucun effet sur la viabilité cellulaire. Ces PS répondent donc à l'un des critères idéaux d'un PS : la non-toxicité en absence de lumière. De plus, une fois photoactivés par la lumière blanche ou la lumière rouge, les deux PpIX polyaminées exercent un effet dose dépendant sur la viabilité cellulaire. Leurs IC₅₀ sont inférieures aux IC₅₀ de la PpIX seule : la vectorisation de la PpIX avec les polyamines a donc permis d'augmenter l'efficacité de ce PS. De plus, concernant ces PpIX polyaminées, les IC₅₀ pour la lignée CHO-MG dépourvue en système de transport des polyamines (PTS) sont 1,6 fois supérieures aux IC₅₀ de la lignée CHO. Ainsi, ce PTS joue bien un rôle dans la capture des PpIX polyaminées. Enfin, les IC₅₀ des PpIX polyaminées sont inférieures en cas de photoactivation par la lumière blanche en comparaison à la photoactivation par la lumière rouge. Cela peut être justifié par le fait que la PpIX absorbe davantage la lumière bleue, présente dans le spectre de la lumière visible, en comparaison à la lumière rouge. L'utilisation du spectre de la lumière blanche dans sa totalité permet une meilleure activation de la PpIX.

1.1.2. Effets du photofrin et du 5-ALA sur la viabilité cellulaire de lignées cancéreuses prostatiques humaines

Ces mêmes tests MTT sont effectués sur 2 lignées cancéreuses prostatiques humaines androgéno-indépendantes PC-3 et DU 145 et une lignée cancéreuse prostatique humaine androgéno-dépendante LNCaP. Comme précédemment, ces tests MTT ont permis de calculer les IC₅₀ de chaque PS pour chacune des lignées étudiées (**Figure R-2**).

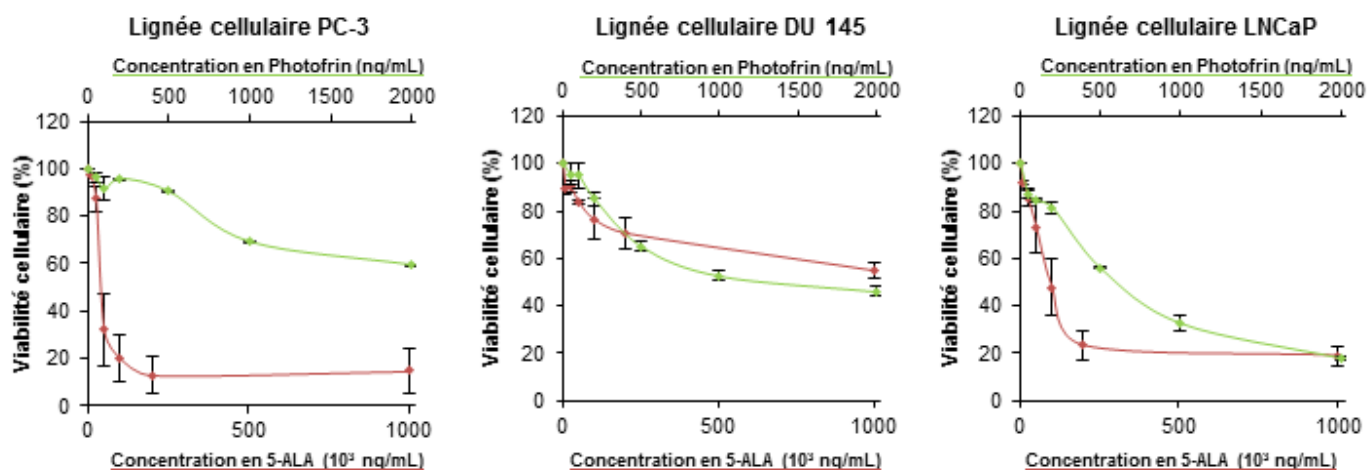


Figure R- 2– Effets du Photofrin et du 5-ALA photoactivés par la lumière rouge sur la viabilité des lignées cellulaires PC-3, DU 145 et LNCaP.

5-ALA : Acide 5 aminolévulinique.

Les IC₅₀ ont été calculées :

IC ₅₀ (ng/mL)	Lumière rouge		
	PC-3	DU 145	LNCaP
Photofrin	3060 ± 49	1135 ± 205	619 ± 27
5-ALA	(78 ± 15) .10 ³	(903 ± 56) .10 ³	(114 ± 17) .10 ³



I.1.3. Effets de la PpIX seule et polyaminée sur la viabilité cellulaire de lignées cellulaires prostatiques humaines

Ces mêmes tests MTT sont effectués sur une lignée prostatique humaine saine RWPE-1, 2 lignées cancéreuses prostatiques humaines androgéno-indépendantes PC-3 et DU 145 et une lignée cancéreuse prostatique humaine androgéno-dépendante LNCaP. Comme précédemment, ces tests MTT ont permis de mettre en évidence le fait que ces nouveaux PS présentent plus de critères rentrant dans l'idéal d'un PS : l'absence de toxicité en absence de lumière, une photoactivation efficace possible à différentes longueurs d'onde ainsi qu'une meilleure efficacité sur les cellules tumorales en comparaison aux cellules saines (**Figure R-3**).

Les IC₅₀ ont pu être déterminées :

IC ₅₀ (ng/mL)	Lumière rouge				Lumière blanche			
	RWPE-1	PC-3	DU 145	LNCaP	RWPE-1	PC-3	DU 145	LNCaP
PpIX	> 200	1102 ±40	365 ±58	262 ±39	113 ± 16	932 ±24	210 ±13	201 ±10
PpIX-dSd	145 ±4	94 ±5	77 ±5	75 ±8	87 ± 6	52 ±3	34 ±2	28 ±1
PpIX-dSm	132 ±14	73 ±2	43 ±1	44 ±1	114 ± 2	41 ±4	32 ±2	30 ±3

Les résultats obtenus sur ces 4 lignées prostatiques sont similaires à ceux obtenus sur les lignées CHO et CHO-MG. En effet, comme précédemment, les PS n'ont aucun effet sur la viabilité cellulaire en absence de photoactivation : la non-toxicité des PS en absence de lumière est mis en évidence.

De plus, les IC₅₀ du PS vectorisé avec la spermidine et la spermine sont respectivement de 3,5 à 10 et de 6 à 15 fois inférieures à celles du PS seul : l'efficacité des PpIX polyaminées est donc plus importante en comparaison à la PpIX seule.

Aussi, les IC₅₀ des PS photoactivés par la lumière blanche sont également inférieures à celles des PS photoactivés par la lumière rouge. Ainsi, l'utilisation d'une même fluence de lumière (75 J/cm²) mais à une longueur d'onde différente, présente des effets différents sur la viabilité cellulaire. Comme pour les 2 lignées précédemment étudiées, ces résultats sont en corrélation avec le spectre d'absorption de la PpIX.

Il semble également important de noter que les IC₅₀ de ces PS sur la lignée prostatique humaine saine RWPE-1 sont supérieures aux IC₅₀ obtenues pour les 3 lignées cancéreuses prostatiques humaines PC-3, DU 145 et LNCaP. Ainsi, ces PS répondent à un second critère idéal des PS : une meilleure efficacité sur les cellules tumorales en comparaison aux cellules saines.



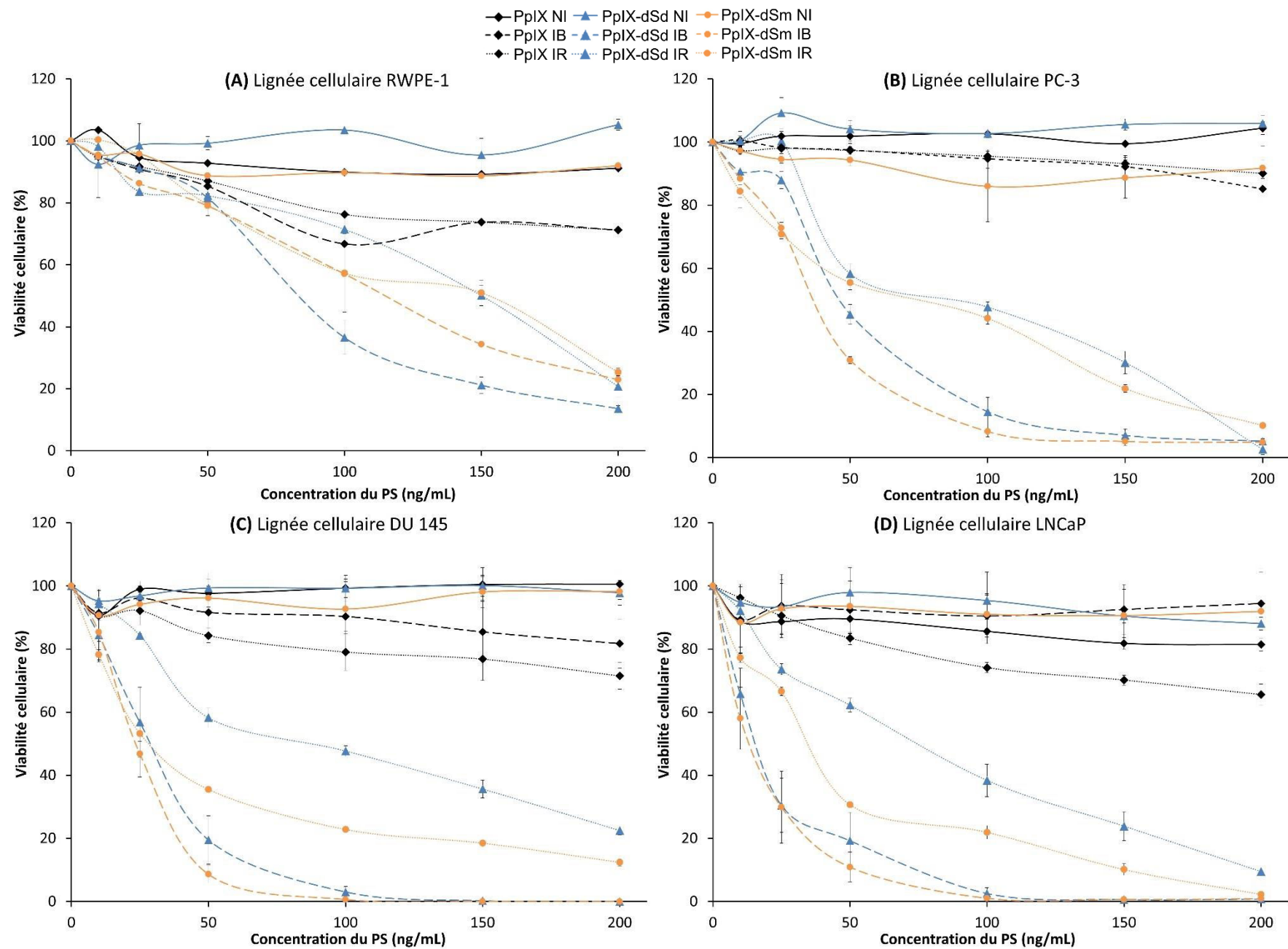


Figure R- 3 – Effets de la protoporphyrine IX seule et polyaminée sur des lignées prostatiques humaines

PpIX : Protoporphyrine IX, PpIX-dSd : protoporphyrine IX dispermidinée, PpIX-dSm : protoporphyrine IX disperminée, NI : non irradiées, IB : irradiation blanche, IR : irradiation rouge)



L'arrêt de la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines après traitement avec la PpIX polyaminée photoactivée peut être dû à un blocage du cycle cellulaire mais également à l'apparition de phénomènes de mort cellulaire. Ainsi, dans la suite de cette étude, les effets de ces PS sur le cycle cellulaire et l'apoptose ont été étudiés.

I.2. Protoporphyrine IX polyaminée et localisation intracellulaire

La protoporphyrine présentant naturellement des propriétés fluorescentes (excitation: 405 nm – émission: 690 nm), sa localisation au sein des trois lignées cancéreuses prostatiques humaines PC-3, DU 145 et LNCaP peut être analysée par microscopie confocale grâce à l'utilisation de longueurs d'onde appropriées.

L'ensemble de ces lignées a été ensemencé dans des labtecks et traité avec la PpIX seule, la PpIX-dSd ou la PpIX-dSm durant 24 h.

Dans un premier temps, les PS sont utilisés à une même concentration (200 ng/ml) en vue d'étudier le rôle des polyamines quant à l'accumulation de la protoporphyrine IX dans les cellules cancéreuses.

L'observation en microscopie confocale permet de mettre en évidence l'accumulation des PS au sein des 3 lignées cellulaires avec une différence significative des niveaux de PpIX en fonction du PS utilisé (**Figure R-4**). En effet, les cellules traitées par la PpIX-dSd ou par la PpIX-dSm présentent un niveau de fluorescence plus important que celles traitées par la PpIX seule. Ainsi, les polyamines permettent une meilleure accumulation de la PpIX dans les cellules. De plus, en comparaison avec la PpIX-dSm, la PpIX-dSd semble davantage captée par les cellules PC-3 et DU 145 à l'inverse des cellules LNCaP qui, elles, semblent davantage capter la PpIX-dSm.

Enfin, une seconde observation au microscope confocal a été réalisée en vue d'étudier la localisation intracellulaire de la PpIX sous ses trois formes (PpIX seule, PpIX-dSd et PpIX-dSm) et surtout une éventuelle colocalisation avec des organites cellulaires. Pour cela, les trois lignées cellulaires ont été traitées par les différents PS (IC_{50}) durant 24h puis soumises à une incubation de 30 min avec le Mitotracker® Green ou 16 h avec le LysoTracker® Green, en vue de mettre en évidence une éventuelle co-localisation entre les PS et la mitochondrie ou les lysosomes (**Figure R-5**).

Aucune co-localisation avec la mitochondrie ou les lysosomes n'a pu être mise en évidence. Néanmoins, il semble que les PS (PpIX, PpIX-dSd ou PpIX-dSm) aient une localisation cytoplasmique.



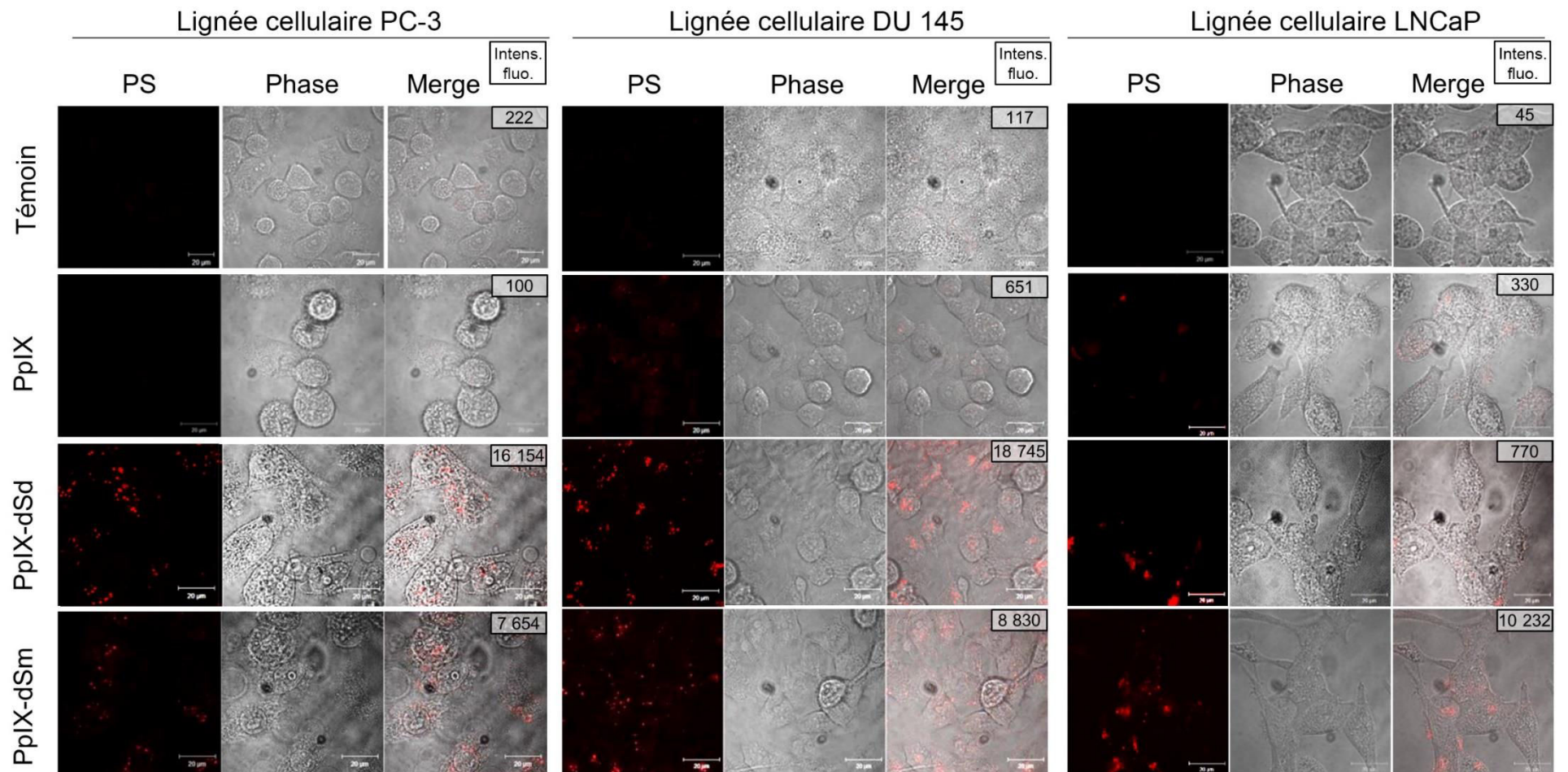


Figure R- 4 – Accumulation de la PpIX dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines en cas de vectorisation ou non par les polyamines
 A une même concentration (200 ng/mL), la protoporphyrine IX (PpIX) est davantage captée par les cellules cancéreuses PC-3, DU 145 et LNCaP lorsqu'elle est vectorisée par les polyamines telles que la spermidine (PpIX-dSd) et la spermine (PpIX-dSm).



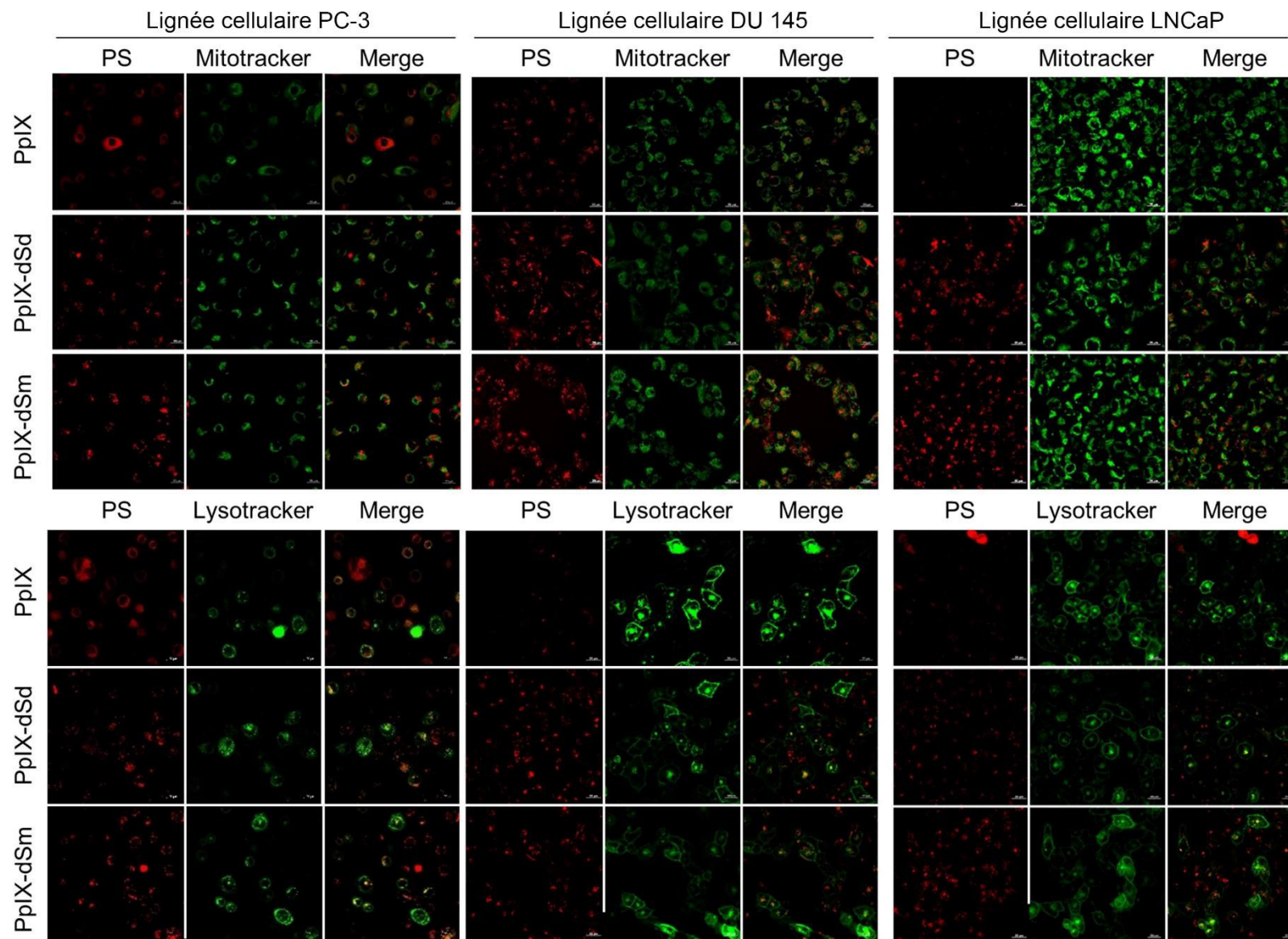


Figure R- 5 – Absence de colocalisation des PS avec la mitochondrie ou les lysosomes dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines Utilisés aux IC₅₀ déterminées pour chaque lignée cellulaire (PC-3, DU145 et LNCaP), les photosensibilisateurs se situent au sein du cytoplasme des cellules sans montrer de colocalisation avec la mitochondrie ou les lysosomes.



I.3. Protoporphyrine IX polyaminée et cycle cellulaire

Les cellules PC-3, DU 145 et LNCaP ont été ensemencées à la densité déterminée, traitées 24h avec la protoporphyrine IX polyaminée pour ensuite être irradiées ou non à la lumière rouge. 24 et 48h après la photoactivation des PS, des cellules sont récupérées pour chaque condition, fixées à l'éthanol, et leur contenu en ADN est évalué par cytométrie en flux suite à un marquage à l'iodure de propidium. Ce dernier est un agent intercalant des acides nucléiques et est fluorescent. Son utilisation va permettre d'analyser le contenu en ADN de chaque cellule et de connaître leur répartition dans le cycle cellulaire. En effet, les cellules dont le contenu en ADN est de 2N chromosomes sont en phase G1, celles entre 2N et 4N chromosomes sont en phase S alors que celles à 4N chromosomes sont en phase G2/M. Enfin, les cellules dont le contenu en ADN est altéré sont en phase sub-G1 soit en apoptose (**Figure R-6**).

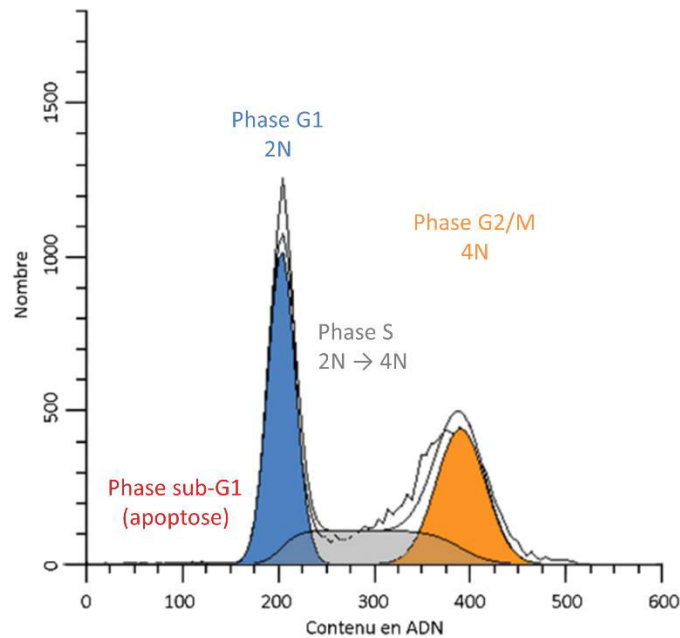


Figure R- 6 – Exemple de représentation de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire
Les cellules sont réparties dans les différentes phases du cycle cellulaire selon leur contenu en ADN : les cellules dont le contenu en ADN est de 2N sont en phase G1, celles entre 2N et 4N sont en phase S alors que celles à 4N sont en phase G2/M. Enfin, les cellules dont le contenu en ADN est altéré sont en phase sub-G1 soit en apoptose.



Les analyses de cette étude de cytométrie en flux révèlent que la lumière seule et les PS seuls n'induisent pas de modification du cycle cellulaire de la lignée cancéreuse prostatique humaine PC-3 aux temps 24 et 48h. En revanche, la photoactivation des PS induit une accumulation des cellules en phase S du cycle cellulaire. En effet, au temps 24 h, le pourcentage de cellules PC-3 en phase S passe de 23,3 % pour les témoins à 41,0% et 39,7% pour les cellules traitées respectivement par la PpIX-dSd et la PpIX-dSm. Au temps 48h, le pourcentage de cellules PC-3 en phase S passe de 12,0 % pour les témoins à 26,0 % en cas de photoactivation de la PpIX-dSd et 35,9 % en cas de photoactivation de la PpIX-dSm (**Figure R-7**).

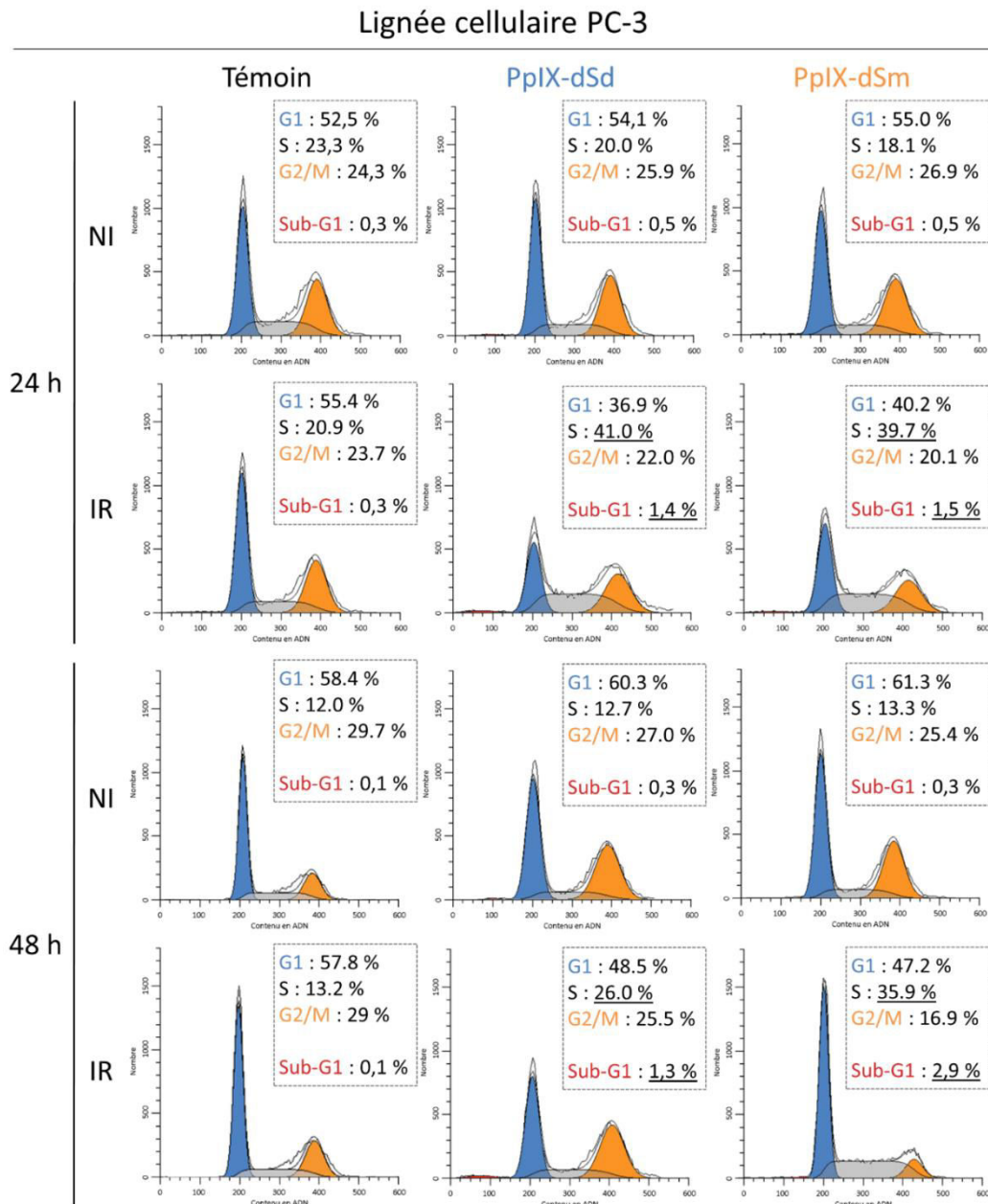


Figure R- 7 – Effets de la protoporphyrine IX polyaminée sur le cycle cellulaire de la lignée cancéreuse prostatique humaine PC-3.

Le contenu en ADN des cellules est analysé par cytométrie en flux après fixation et marquage à l'iodure de propidium. La photoactivation de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm induit un arrêt du cycle cellulaire en phase S dans les cellules cancéreuses PC-3.



Concernant la lignée cellulaire DU 145, la lumière seule et la PpIX-dSd seule n'ont pas d'effet sur le cycle cellulaire aux 2 temps étudiés. En revanche, la photoactivation de la PpIX-dSd induit également une augmentation de la proportion de cellules en phase S : de 39,8 % pour les témoins à 52,7 % au temps 24h et de 31,6 % à 54 % au temps 48h. De plus, la PpIX-dSm seule a déjà un effet sur le cycle cellulaire. En effet, ce PS, même en absence de photoactivation, induit une augmentation du taux de cellules en phase G1 : de 44,2 % pour les témoins à 65,3 % au temps 24 h et de 49,2 % à 65,8 % au temps 48 h. Cette accumulation des cellules en phase G1 est à l'origine d'une diminution de la proportion de cellules en phase S. Enfin, la photoactivation de la PpIX-dSm induit une accumulation des cellules en phase S en comparaison aux cellules traitées mais non irradiées : de 19,4 % à 29,7 % à 24 h et de 25,3 % à 38,9 % à 48 h (**Figure R-8**).

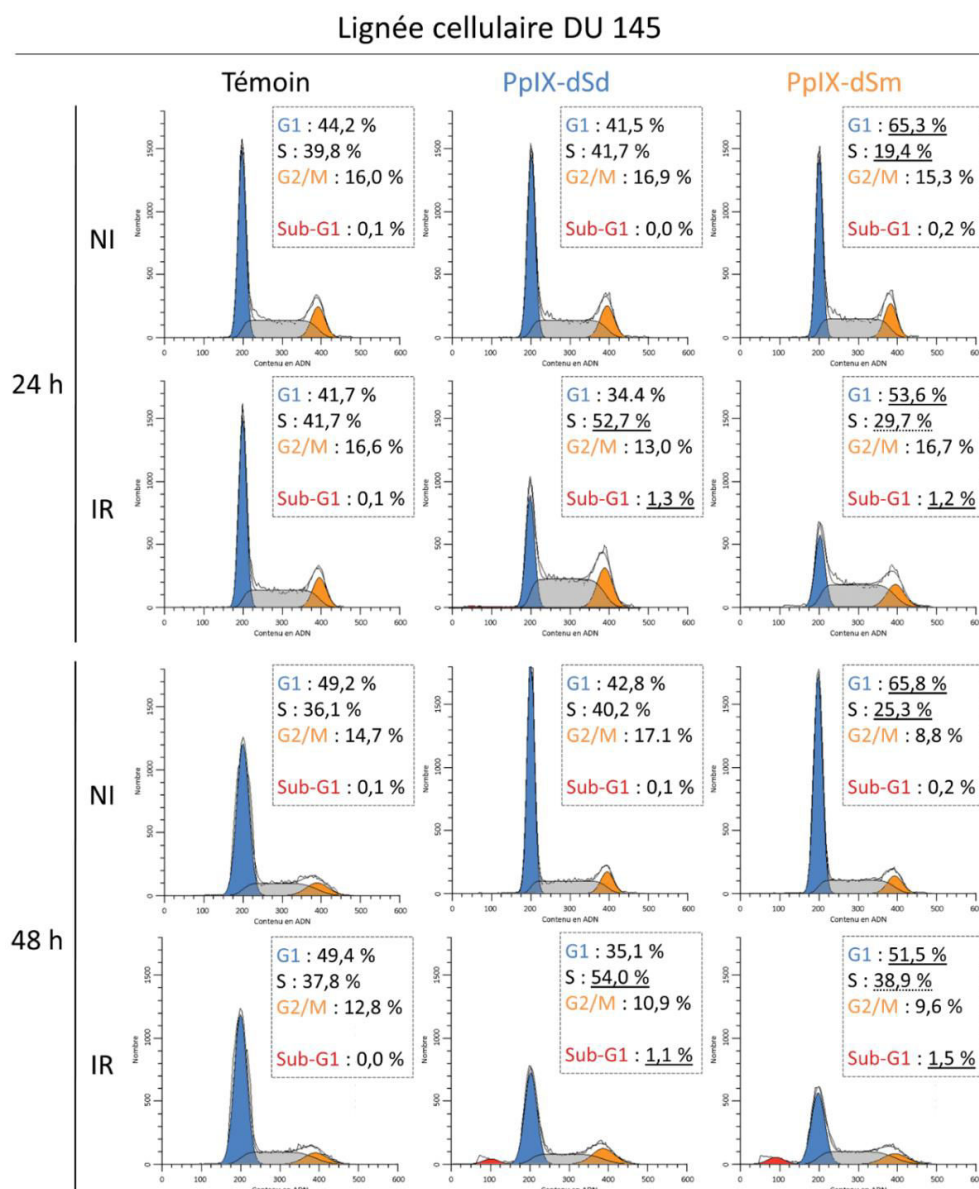


Figure R- 8 - Effets de la protoporphyrine IX polyaminée sur le cycle cellulaire de la lignée cancéreuse prostatique humaine DU 145.

Le contenu en ADN des cellules est analysé par cytométrie en flux après fixation et marquage à l'iodure de propidium. La photoactivation de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm induit un arrêt du cycle cellulaire en phase S dans les cellules cancéreuses DU 145. Néanmoins la PpIX-dSm seule induit une augmentation de la proportion de cellules en phase G1.



Concernant la lignée LNCaP, la lumière seule et les PS seuls ne semblent pas avoir d'effet sur la répartition des cellules dans le cycle cellulaire. De plus, une photoactivation des PS par la lumière rouge ne semble pas avoir d'effet sur la progression des cellules dans le cycle cellulaire puisque la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle semble similaire à celle des cellules témoins (**Figure R-9**).

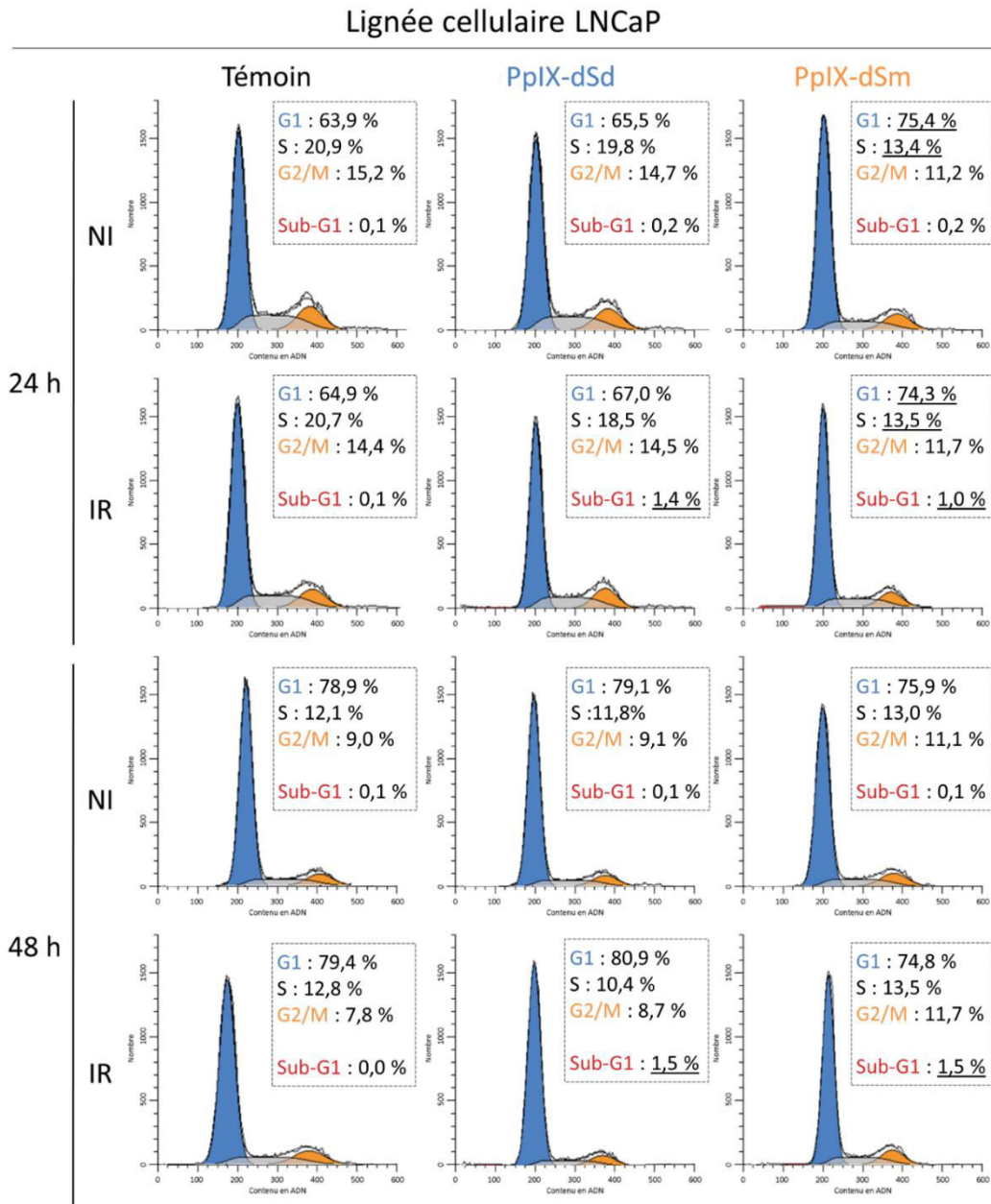


Figure R- 9 - Effets de la protoporphyrine IX polyaminée sur le cycle cellulaire de la lignée cancéreuse prostatique humaine LNCaP.

Le contenu en ADN des cellules est analysé par cytométrie en flux après fixation et marquage à l'iodure de propidium. La photoactivation de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm ne semble induire aucun effet sur le contenu en ADN des cellules LNCaP.

Ainsi, les effets des deux PS d'intérêt sur la répartition des cellules dans le cycle cellulaire semblent différer selon la lignée cellulaire étudiée.



Un blocage des cellules dans une phase particulière du cycle cellulaire est généralement la conséquence de l'activation des principaux régulateurs du cycle cellulaire que sont les différents complexes cycline/CDK, p53 et p21. L'expression des cyclines et des protéines CDK est étudiée par western-blots réalisés sur des extraits protéiques totaux de cellules PC-3 et DU 145 traitées par la protoporphyrine IX polyaminée photoactivée ou non par la lumière rouge. L'expression de ces différents régulateurs est étudiée aux temps 24 et 48h.

Dans les cellules PC-3, l'expression des protéines impliquées dans la progression de la phase G1 et la phase S telles que la cycline E, la cycline A et CDK2 est augmentée en cas de photoactivation des PS aux temps 24 et 48h. En revanche, dans ces mêmes conditions, une diminution d'expression de la protéine CDK1, protéine impliquée dans le passage de la phase S à la phase G2/M, est observée. Enfin, l'expression de la cycline A, impliquée dans la progression de la phase G2/M, est augmentée (**Figure R-10**).

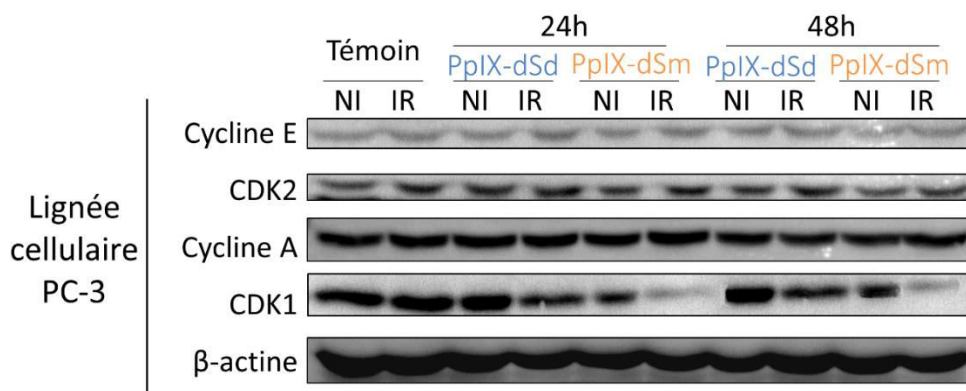


Figure R- 10 – Effets des photosensibilisateurs sur l'expression des acteurs clés du cycle cellulaire dans les cellules PC-3.

Les niveaux d'expression des cyclines E et A et de CDK1 et CDK2 ont été étudiés par western-blot. La photoactivation des PS induit une augmentation de l'expression de la cycline E, la cycline A et CDK2 et une diminution de l'expression de CDK1.

Des résultats similaires ont été retrouvés 24 et 48h après la photoactivation de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm dans les cellules DU 145. En effet, sont observées une augmentation d'expression des protéines impliquées dans la progression du cycle telles que la cycline E, la cycline A et CDK2 ainsi qu'une diminution d'expression de la protéine CDK1 (**Figure R-11**).

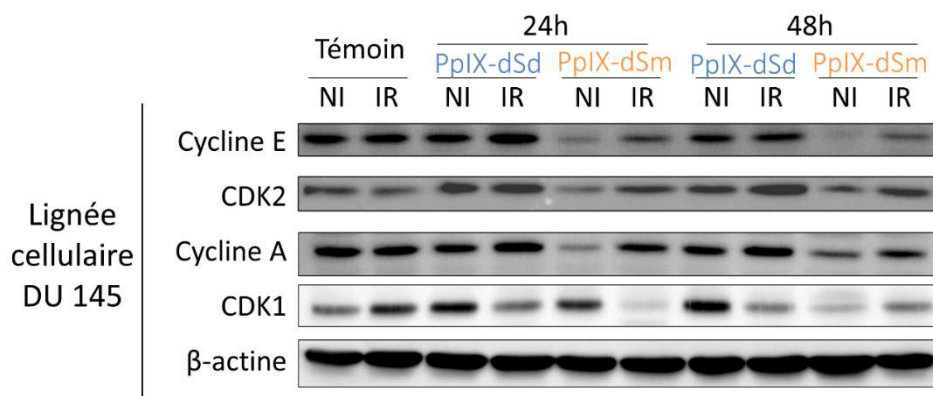


Figure R- 11 – Effets des photosensibilisateurs sur l'expression des acteurs clés du cycle cellulaire dans les cellules DU 145.

Les niveaux d'expression des cyclines E et A et de CDK1 et CDK2 ont été étudiés par western-blot. La photoactivation des PS induit une augmentation de l'expression de la cycline E, la cycline A et CDK2 et une diminution de l'expression de CDK1.



L'ensemble de ces résultats, et notamment la diminution d'expression de la protéine CDK1, impliquée dans la transition de la phase S à la phase G2/M, peuvent être mis en corrélation avec l'arrêt en phase S observée dans les cellules PC-3 et DU 145 en cas de photoactivation des deux PS d'intérêt. Les niveaux d'expression des cyclines et des protéines CDK restent encore à analyser dans les cellules LNCaP soumises à la photoactivation de la PpIX-dSd ou de la PpIX-dSm.

Ces complexes cycline/CDK sont régulés en amont par l'activation de p21 et de p53. L'activation de p21 peut être dépendante ou non de l'activation de p53 et conduit à un arrêt du cycle dans différentes phases, principalement les phases G1 et G2/M. La protéine p53 est une protéine dont l'activité est régulée par phosphorylation. La forme de p53 phosphorylée sur la sérine 15 est la forme la plus active de la protéine. L'expression des régulateurs du cycle cellulaire tels que p53 et p21 a été étudiée par western-blot. Ces western blots ont été réalisés sur des extraits protéiques totaux de cellules PC-3, DU 145 et LNCaP traitées par la protoporphyrine IX polyaminée photoactivée ou non par la lumière rouge. L'expression de ces différents régulateurs est étudiée aux temps 24 et 48h.

Concernant la lignée PC-3, la lumière seule et les PS seuls n'ont pas d'effet sur l'expression de p53 et celle de sa forme phosphorylée. En revanche en cas de photoactivation des PS, une inhibition de l'expression de p53 est démontrée par la diminution d'expression de ses 2 formes (non phosphorylée et phosphorylée sur la sérine 15), et ce aux temps 24 et 48h. La protéine p21, quant à elle, voit son expression augmenter 24h après la photoactivation de la PpIX-dSd mais celle-ci diminue 48h après la photoactivation de la PpIX-dSd et 24 et 48h après la photoactivation de la PpIX-dSm (**Figure R-12**).

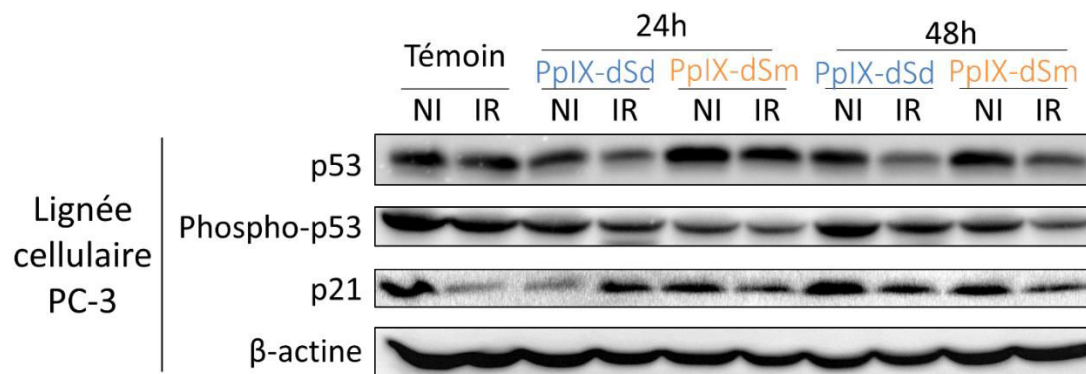


Figure R- 12 – Effets des photosensibilisateurs sur l'expression des régulateurs du cycle cellulaire dans les cellules PC-3.

Les niveaux d'expression de p53 et de sa forme phosphorylée, et de p21 ont été étudiés par western-blot. La photoactivation des PS induit une diminution de l'expression des 2 formes de p53 et de p21.



Concernant la lignée cellulaire DU 145, il semble que la photoactivation de l'un ou l'autre des PS n'ait aucun effet sur le niveau d'expression de p53 ou de sa forme phosphorylée aux temps 24 et 48h. En revanche, le niveau d'expression de la protéine p21 varie selon les conditions. En effet, la PpIX-dSd seule ne semble pas avoir d'influence sur l'expression de p21 en comparaison aux cellules témoins pour les temps 24 et 48h. En revanche, en cas de photoactivation de la PpIX-dSd, une augmentation d'expression de p21 est révélée pour ces 2 temps (**Figure R-13**).

En corrélation avec les résultats de cytométrie en flux obtenus précédemment, il semble que la PpIX-dSm seule induise déjà un effet : il s'agit ici d'une diminution d'expression de p21. Sa photoactivation induit néanmoins une augmentation d'expression de la protéine p21 aux temps 24 et 48h en comparaison aux cellules traitées par la PpIX-dSm mais non irradiées. Dans cette lignée cellulaire, l'activation de p21 ne semble pas être dépendante de l'activation de p53 puisque seule l'activation de p21 est observée en cas de photoactivation des PS, l'expression de la forme phosphorylée de p53 étant comparable aux cellules témoins.

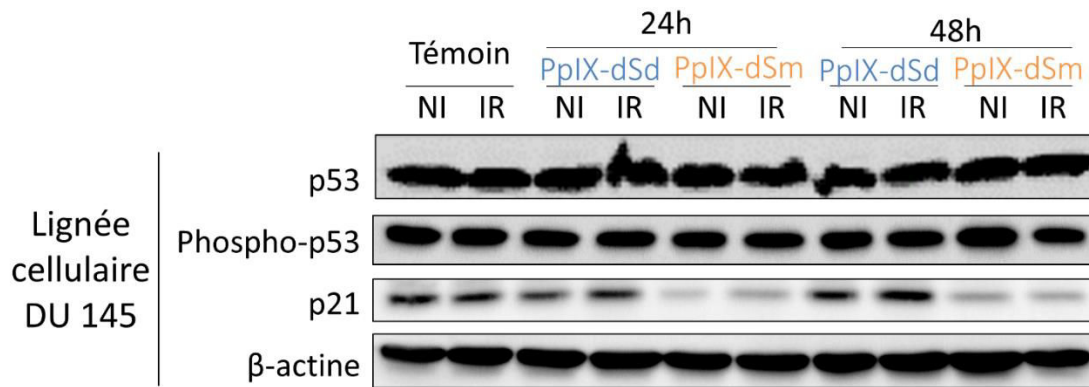


Figure R- 13 – Effets des photosensibilisateurs sur l'expression des régulateurs du cycle cellulaire dans les cellules DU 145.

Les niveaux d'expression de p53 et de sa forme phosphorylée, et de p21 ont été étudiés par western-blot. La photoactivation des PS n'a pas d'effet sur l'expression des 2 formes de p53 mais augmente l'expression de p21.



Concernant la lignée cellulaire LNCaP, la photoactivation des PS induit une diminution d'expression de la protéine p53 et de sa forme phosphorylée ainsi qu'une diminution d'expression de la protéine p21. L'absence d'activation de p21 peut être corrélée à la progression des cellules LNCaP dans le cycle cellulaire. En effet, la photoactivation des PS dans cette lignée n'induit pas d'arrêt du cycle cellulaire (**Figure R-14**).

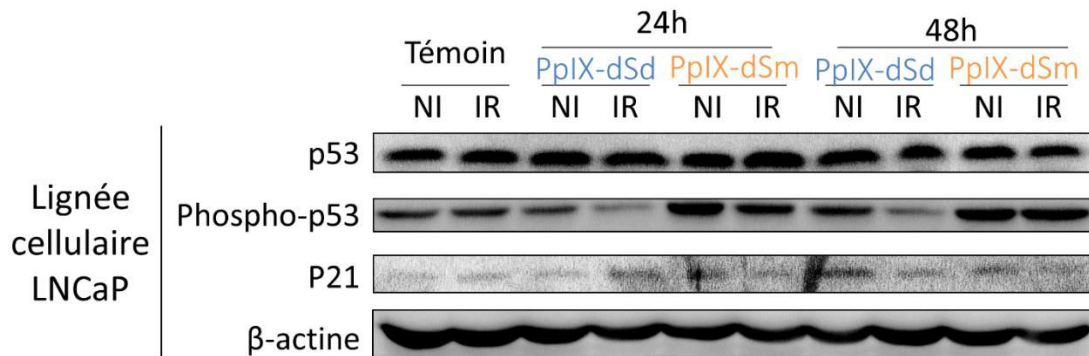


Figure R- 14 – Effets des photosensibilisateurs sur l'expression des régulateurs du cycle cellulaire dans les cellules LNCaP.

Les niveaux d'expression de p53 et de sa forme phosphorylée, et de p21 ont été étudiés par western-blot. La photoactivation des PS induit une diminution d'expression de p53 et de sa forme phosphorylée ainsi qu'une diminution d'expression de p21

Cette analyse du contenu en ADN et de l'expression des différents régulateurs et acteurs du cycle cellulaire permettent d'affirmer que les effets des PS sur le cycle cellulaire des cellules cancéreuses prostatiques humaines diffèrent selon le PS utilisé et la lignée cellulaire étudiée. En effet, les 2 PS (PpIX-dSd et PpIX-dSm) induisent un blocage en phase S des cellules PC-3 et DU 145 alors que les 2 PS n'ont aucun effet sur le cycle cellulaire des cellules LNCaP. Ce blocage en phase S a pu être mis en corrélation avec une augmentation d'expression des protéines impliquées dans la progression du cycle telles que la cycline E, la cycline A et CDK2 ainsi qu'une diminution d'expression de la protéine CDK1, une protéine impliquée dans la transition de la phase S à la phase G2. Ces complexes cycline/CDK étant régulés en amont par l'activation de p21 et de p53, p53 pourrait jouer un rôle dans cette différence puisque les trois lignées cellulaires étudiées présentent des profils différents quant à leur expression de p53.

Cette analyse du cycle cellulaire permet également de mettre en évidence le fait que les PS photoactivés par la lumière rouge induisent l'apparition d'une population dite sub-G1 à 24 et 48 h. Cette population présente donc un contenu en ADN altéré et est généralement associée à des cellules en cours d'apoptose.



I.4. Protoporphyrine IX polyaminée et mort cellulaire programmée

Dans le cadre de la PDT, lorsque les PS sont soumis à une irradiation lumineuse, un transfert d'énergie s'effectue du PS à l'état triplet vers l'oxygène moléculaire induisant le retour du PS à son état fondamental et la formation d'espèces oxygénées réactives (ROS), souvent à l'origine de l'induction du phénomène d'apoptose, et plus exactement de sa voie intrinsèque. L'induction de l'apoptose conduit à l'apparition de modifications précoces du fonctionnement cellulaire, cela notamment au niveau de la mitochondrie, puis à l'activation du processus d'exécution de l'apoptose via des caspases pour induire, finalement, la fragmentation de l'ADN.

I.4.1. Production d'espèces oxygénées réactives

Les cellules PC-3, DU 145 et LNCaP sontensemencées, traitées et irradiées ou non à la lumière rouge. Suite à l'irradiation, un dosage des ROS est effectué grâce au kit « DCFDA cellular ROS detection assay kit » (Abcam®) qui utilise la sonde DCFDA. Après diffusion dans la cellule, cette dernière est désacétylée par les estérases cellulaires en composé non fluorescent, qui, une fois oxydé par les ROS en DCF, va devenir fluorescent (excitation/émission : 485/535 nm). Le taux de ROS dans la cellule est donc corrélé à l'intensité de fluorescence de la sonde. Les cellules traitées durant 3h avec le TBHP (Tert-butyl hydrogen peroxide) sont utilisées comme contrôle positif.

Les cellules traitées par les deux PS (PpIX-dSd et PpIX-dSm aux IC₅₀) photoactivés par la lumière rouge présentent une augmentation du taux de ROS intracellulaire. Concernant la PpIX-dSd, sa photoactivation induit une augmentation du taux intracellulaire de ROS de l'ordre de 2,2 pour les cellules PC-3, 2,3 pour les cellules DU 145 et 1,5 pour les cellules LNCaP, en comparaison aux cellules témoins. De plus, suite à la photoactivation de la PpIX-dSm dans ces mêmes lignées, l'augmentation du taux intracellulaire de ROS est de l'ordre de 1,7 pour les cellules PC-3, 1,8 pour les cellules DU 145 et 2,1 pour les cellules LNCaP, en comparaison aux cellules témoins (**Figure R-15**).

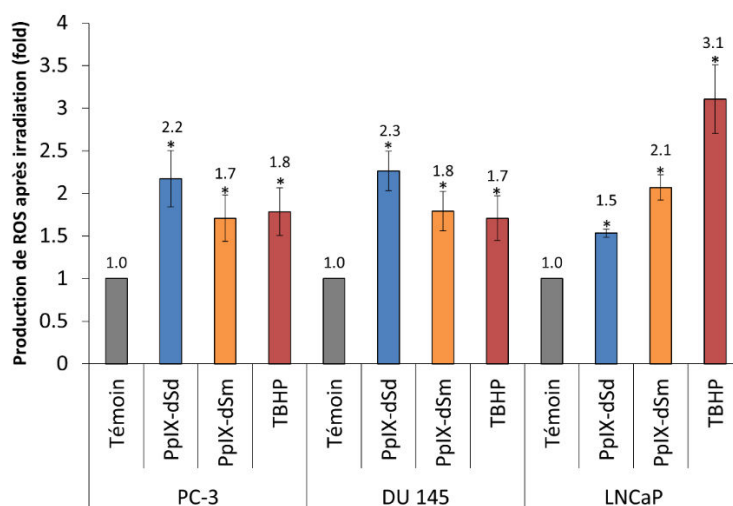


Figure R- 15 – Effets des photosensibilisateurs sur la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3, DU 145 et LNCaP.

Après ensemencement et traitement par la PpIX-dSd et la PpIX-dSm ou par TBHP (Tert-butyl hydrogen peroxide), les cellules PC-3, DU 145 et LNCaP sont marquées à l'aide de la sonde DCFDA (20µM) et irradiées par la lumière rouge. 1h après l'irradiation, l'intensité de fluorescence est analysée (ex/em : 485/535 nm). TBHP est utilisé comme contrôle positif. Les valeurs obtenues suite à l'irradiation sont rapportées aux valeurs des conditions correspondantes sans irradiation.



I.4.2. Chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$)

La chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) est considérée comme un événement précoce au cours du déroulement de l'apoptose. Ce phénomène a été analysé dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3, DU 145 et LNCaP, traitées par la PpIX-dSd et la PpIX-dSm (aux IC_{50}), photoactivées ou non par la lumière rouge. Le processus de chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi_m$) a été étudié 24h après l'irradiation grâce à l'utilisation de la sonde JC-1. En cas de potentiel membranaire mitochondrial intact, la sonde JC-1, un cation lipophile fluorescent, se retrouve concentrée dans la mitochondrie sous forme d'agrégats et émet une fluorescence rouge. En revanche, en cas de déstabilisation de ce potentiel membranaire mitochondrial, JC-1 existe sous forme de monomères et émet une fluorescence verte. Cette fluorescence est observée en microscopie confocale.

Dans les trois lignées cancéreuses prostatiques humaines utilisées, la sonde JC-1 émet une fluorescence rouge dans les cellules témoins (non traitées) : le potentiel membranaire mitochondrial est donc intact.

Cette fluorescence rouge de JC-1 est également retrouvée dans les cellules non traitées par les PS mais ayant été soumises à l'irradiation et également dans les cellules traitées par les PS (PpIX-dSd ou PpIX-dSm) n'ayant pas subi d'irradiation. Ainsi, la lumière seule ainsi que les PS seuls n'ont aucun effet sur le potentiel membranaire mitochondrial des cellules cancéreuses PC-3 (**Figure R-16**), DU 145 (**Figure R-17**) et LNCaP (**Figure R-18**).

En revanche, en cas de photoactivation de la PpIX-dSd ou de la PpIX-dSm par la lumière rouge, la sonde JC-1 émet une fluorescence verte. Ainsi, les deux PS photoactivés induisent une chute du potentiel membranaire mitochondrial dans les trois lignées cancéreuses prostatiques humaines utilisées.

Enfin, afin de conclure quant au rôle de la production des ROS observée précédemment dans cette chute du potentiel membranaire mitochondrial, un inhibiteur de cette production de ROS a été utilisé : la N-acétyl-cystéine (NAC). La NAC est un acide aminé non essentiel agissant à deux niveaux : elle peut s'oxyder en réduisant la quantité de radicaux libres et elle stimule la production de glutathion qui est un anti-oxydant.

Ainsi, les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3, DU 145 et LNCaP sontensemencées puis traitées par les PS durant 24h. Un traitement des cellules par la NAC (10 μ M) est effectué 1 h avant l'irradiation de celles-ci par la lumière rouge et le potentiel membranaire mitochondrial est analysé 24 h après. Les résultats de microscopie confocale mettent en évidence une fluorescence rouge de la sonde JC-1 en cas de co-traitement par les PS et par la NAC des trois lignées cancéreuses prostatiques humaines utilisées. La présence de la NAC, et donc l'inhibition de la production des ROS, permet d'annuler la chute du potentiel membranaire mitochondrial induite par les PS photoactivés par la lumière rouge. Ainsi, la production des ROS précédemment mise en évidence est bien à l'origine de la déstabilisation de la membrane mitochondriale des lignées cancéreuses prostatiques humaines PC-3, DU 145 et LNCaP.



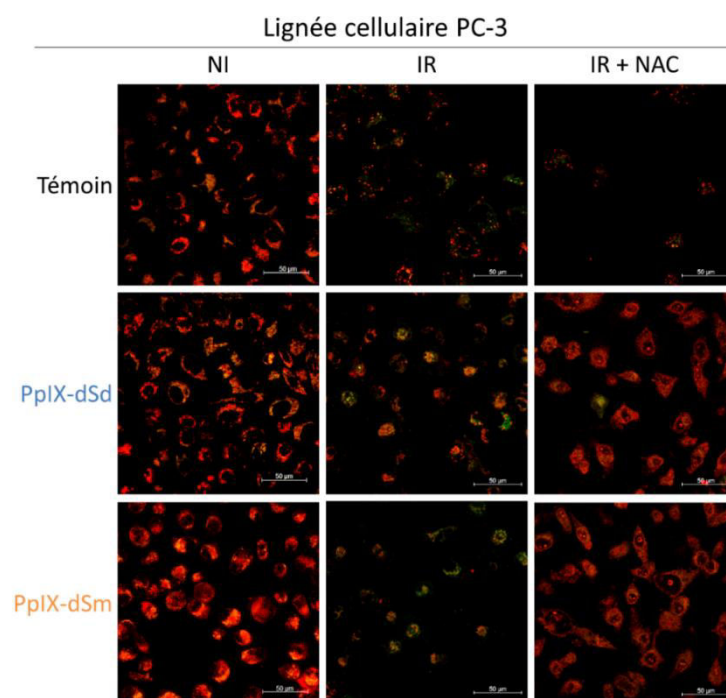


Figure R- 16 – Effets des photosensibilisateurs sur le potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

Les cellules PC-3 sont traitées par la PpIX-dSd ou la PpIX-dSm puis irradiées (IR) ou non (NI) par la lumière rouge. Afin d'étudier les effets de l'inhibition de la production des ROS sur le potentiel membranaire mitochondrial, la N-acétyl-cystéine (NAC) a été utilisée.

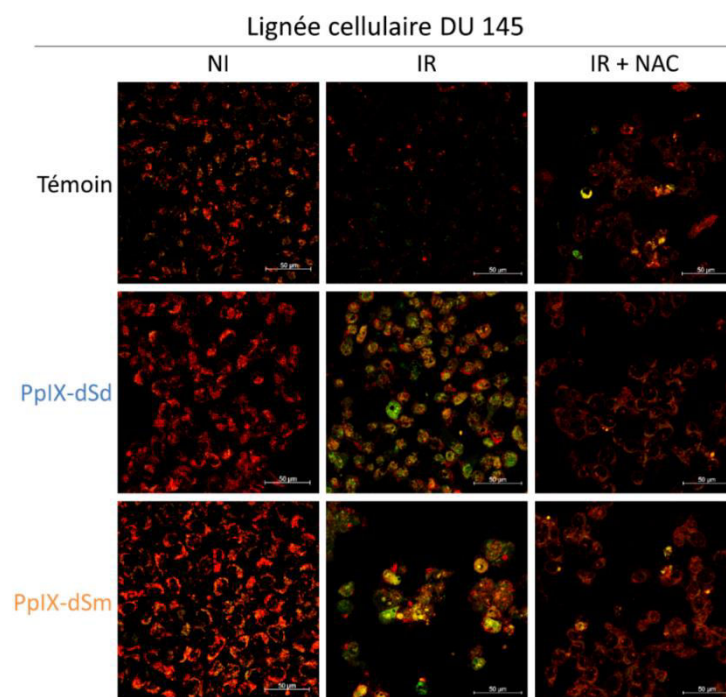


Figure R- 17 – Effets des photosensibilisateurs sur le potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145.

Les cellules DU 145 sont traitées par la PpIX-dSd ou la PpIX-dSm puis irradiées (IR) ou non (NI) par la lumière rouge. Afin d'étudier les effets de l'inhibition de la production des ROS sur le potentiel membranaire mitochondrial, la N-acétyl-cystéine (NAC) a été utilisée.



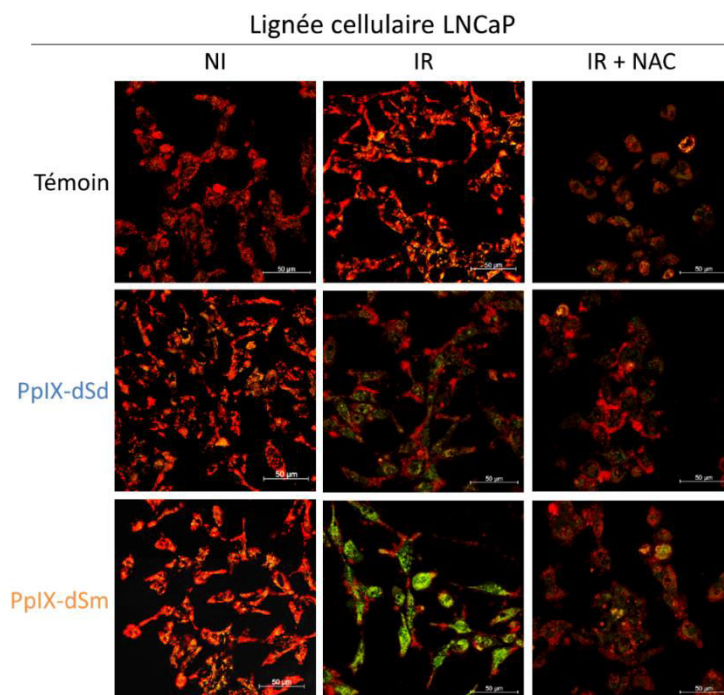


Figure R- 18 – Effets des photosensibilisateurs sur le potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP.

Les cellules LNCaP sont traitées par la PpIX-dSd ou la PpIX-dSm puis irradiées (IR) ou non (NI) par la lumière rouge. Afin d'étudier les effets de l'inhibition de la production des ROS sur le potentiel membranaire mitochondrial, la N-acétyl-cystéine (NAC) a été utilisée.

I.4.3. Activation de la voie apoptotique caspase-dépendante

La chute du potentiel membranaire mitochondrial est à l'origine de la sortie de cytochrome c vers le cytosol, induisant ainsi la formation de l'apoptosome et l'activation de la procaspase-9 initiateur (47 KDa). L'activation de cette dernière est induite par un clivage, observable sur western-blot (fragments de 37 et 35 KDa). La caspase 9 active va activer la caspase 3 effectrice dont l'activation peut être étudiée à l'aide d'un kit ELISA. L'activation de la caspase 3 est à l'origine du clivage de la protéine PARP (110 KDa) qui est une enzyme de réparation de l'ADN. Son clivage, correspondant à son inactivation, génère deux fragments dont un de 89 kD, et est observable en western blot.

Dans les 3 lignées cancéreuses prostatiques PC-3, DU 145 et LNCaP traitées ou non par la PpIX polyaminée photoactivée ou non par la lumière rouge, l'activation de la procaspase 9 et l'inactivation de la PARP par clivage ont été étudiées par western blot 24 et 48h après l'irradiation. Un dosage de la caspase-3 activée est effectué à l'aide d'un kit ELISA.

Concernant la lignée cellulaire PC-3, l'analyse du clivage de la caspase-9 et de la protéine PARP-1 par western-blot a révélé que la lumière seule et les PS seuls n'avaient pas d'effet sur ces deux phénomènes. Néanmoins, en cas de photoactivation de la PpIX-dSd par la lumière rouge, on observe une diminution de l'expression de la pro-caspase 9 corrélée à une augmentation d'expression de la caspase 9 active et à l'apparition d'un fragment clivé actif à 48h. Cette activation de la caspase 9 est également démontrée en cas de photoactivation de PpIX-dSm à 24 et 48h par une augmentation d'expression de la caspase 9 active (**Figure R-19**).



Lignée cellulaire PC-3

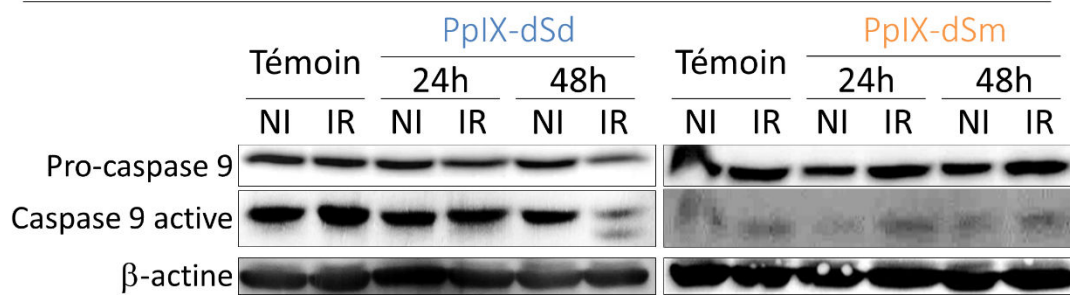


Figure R- 19 – Effets des photosensibilisateurs sur l’activation de la caspase-9 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

Les cellules PC-3 sont traitées par la PpIX-dSd ou la PpIX-dSm puis irradiées (IR) ou non (NI) par la lumière rouge. L’activation de la caspase-9 est étudiée par western-blot par visualisation de son fragment clivé en cas de photoactivation des PS.

Concernant la lignée cellulaire DU 145, les résultats semblent similaires. En effet, la lumière seule et les PS seuls n’ont aucun effet sur l’expression de la procaspase 9. En revanche, en cas de photoactivation de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm par la lumière rouge, on observe une diminution d’expression de la procaspase 9 à 24 et 48h après l’irradiation. Ce phénomène est corrélé à l’apparition de la forme clivée de la caspase 9, signe de son activation (**Figure R-20**).

Lignée cellulaire DU 145

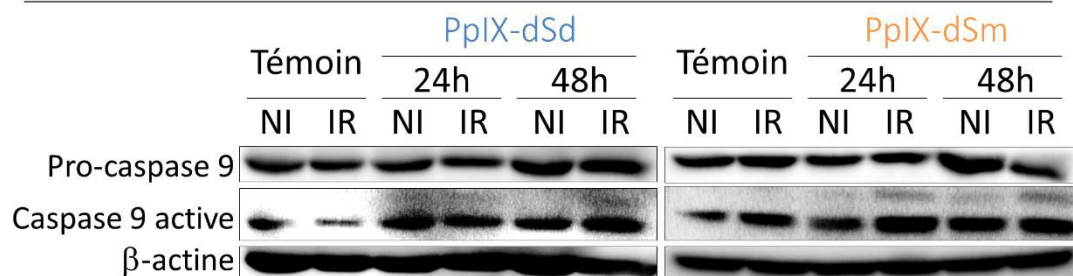


Figure R- 20 – Effets des photosensibilisateurs sur l’activation de la caspase-9 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145.

Les cellules DU 145 sont traitées par la PpIX-dSd ou la PpIX-dSm puis irradiées (IR) ou non (NI) par la lumière rouge. L’activation de la caspase-9 est étudiée par western-blot par visualisation de son fragment clivé en cas de photoactivation des PS.

Enfin, des résultats similaires sont retrouvés quant aux effets des PS sur la lignée cellulaire LNCaP. En effet, la lumière seule et les PS seuls n’ont pas d’effet sur l’expression des différentes formes de caspase-9. En revanche, la photoactivation des PS semble avoir très peu d’effet sur l’expression de la pro-caspase 9 mais induit une augmentation de l’expression de la caspase 9 active 24 et 48h après irradiation (**Figure R-21**).



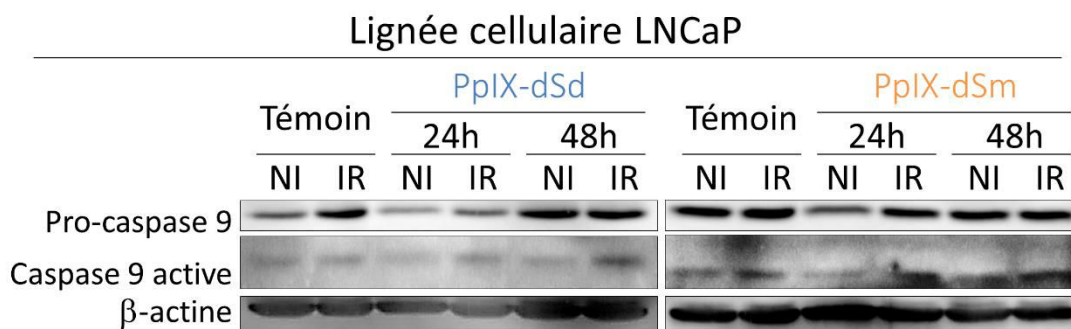


Figure R- 21 – Effets des photosensibilisateurs sur l’activation de la caspase-9 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP.

Les cellules LNCaP sont traitées par la PpIX-dSd ou la PpIX-dSm puis irradiées (IR) ou non (NI) par la lumière rouge. L’activation de la caspase-9 est étudiée par western-blot par visualisation de son fragment clivé en cas de photoactivation des PS.

Ainsi, les résultats obtenus quant à l’activation de la caspase 9 effectrice dans les 3 lignées cancéreuses prostatiques humaines étudiées sont en corrélation avec ceux obtenus quant à l’étude du potentiel membranaire mitochondrial. En effet, le rôle de la lumière seule et des PS seuls a pu être discriminé. Cette phase effectrice de l’apoptose est bien uniquement induite par les PS photoactivés par la lumière rouge.

Ces premiers résultats permettent de mettre en évidence l’induction de l’apoptose par les PS photoactivés dans les trois lignées cancéreuses prostatiques humaines. L’exécution de l’apoptose proprement dite est ensuite analysée à travers l’étude de l’activation de la caspase-3 effectrice et des conséquences de cette activation au niveau du clivage de substrats cellulaires tels que la PARP.

L’activation de la caspase-3 au cours de l’induction de l’apoptose conduit à la phase d’exécution de l’apoptose qui se traduit par le clivage de nombreux substrats cellulaires essentiels à la survie des cellules. La caspase-3 reconnaît une séquence peptidique particulière (DEVD) sur ses substrats et clive les protéines après cette séquence. Les variations de l’activité de la caspase-3 sont étudiées au moyen d’un peptide inhibiteur possédant la séquence DEVD mais ne pouvant être clivé. Ce peptide reste bloqué dans le site catalytique des caspases-3 actives et permet de quantifier l’activation de la caspase-3 en réponse à la PDT. Ainsi, la quantité de caspase-3 active est évaluée dans les cellules PC-3, DU 145 et LNCaP 24 et 48h après la photoactivation de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm par la lumière rouge (**Figure R-22**).

Ainsi, la caspase-3 a été montrée activée au temps 24h dans les trois lignées cellulaires en cas de photoactivation des 2 PS. Cette activation atteint son maximum à 24h et diminue à 48h pour l’ensemble des conditions sauf en cas de photoactivation de la PpIX-dSm dans les cellules DU 145 où le taux d’activation de la caspase 3 est plus important à 48h.



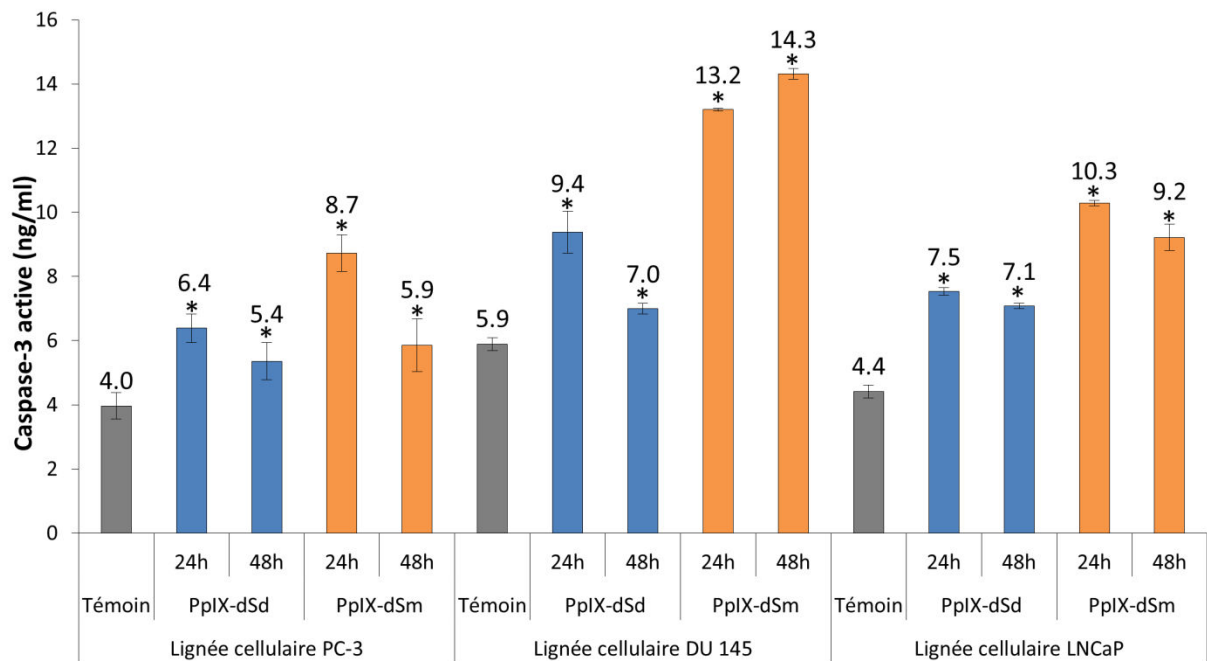


Figure R- 22 – Effets des photosensibilisateurs sur l’activation de la caspase-3 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3, DU 145 LNCaP.

Les cellules PC-3, DU 145 et LNCaP ont été traitées par la PpIX-dSd et la PpIX-dSm photoactivées par la lumière rouge. 24 et 48h après l’irradiation, les cellules sont mises en présence d’un inhibiteur protéique spécifique des caspases-3 actives permettant de quantifier la caspase-3 active dans les cellules. La photoactivation des PS induit l’activation de la caspase 3.

L’un des substrats de la caspase 3 est la protéine PARP. Il s’agit d’une enzyme de réparation de l’ADN. Au cours de l’exécution de l’apoptose, le clivage de la PARP (112 kD) génère deux fragments dont un, de 85 kD. Ce clivage est observable en western blot.

Dans la lignée cellulaire PC-3, la photoactivation des 2 PS induit une diminution d’expression de sa forme native corrélée à une augmentation d’expression de sa forme clivée. On remarque tout de même que la bande correspondant à la forme clivée de la PARP en cas de photoactivation de la PpIX-dSd est très peu visible. Néanmoins, la diminution de l’expression de la forme native suggère qu’il y a bien eu clivage et donc inactivation de la protéine (**Figure R-23**).

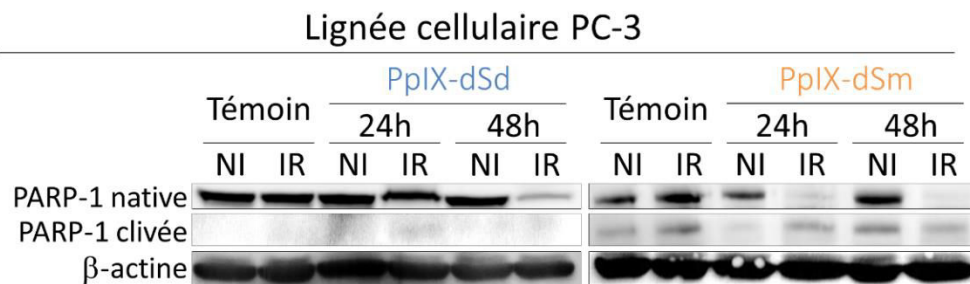


Figure R- 23 – Effets des photosensibilisateurs sur le clivage de PARP-1 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

Les cellules PC-3 sont traitées par la PpIX-dSd ou la PpIX-dSm puis irradiées (IR) ou non (NI) par la lumière rouge. L’inactivation de PARP-1 est étudiée par western-blot par visualisation de son fragment clivé en cas de photoactivation des PS.



Il en est de même pour la lignée cellulaire DU 145. En effet, la photoactivation des PS induit une inhibition de l'expression de la forme native de la protéine PARP corrélée à une augmentation d'expression de la forme clivée (**Figure R-234**).

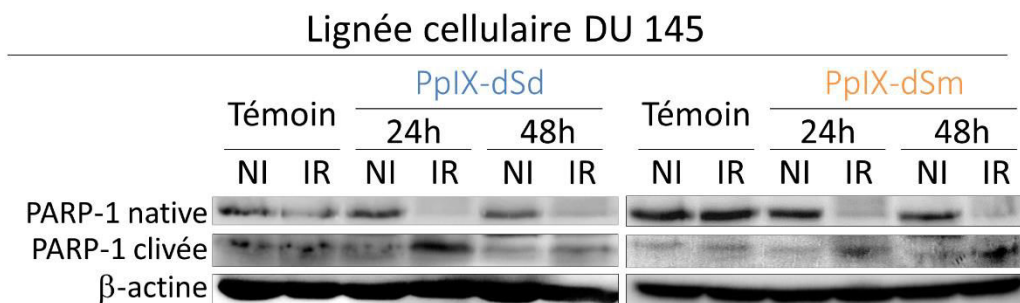


Figure R- 24 – Effets des photosensibilisateurs sur le clivage de PARP-1 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145.

Les cellules DU 145 sont traitées par la PpIX-dSd ou la PpIX-dSm puis irradiées (IR) ou non (NI) par la lumière rouge. L'inactivation de PARP-1 est étudiée par western-blot par visualisation de son fragment clivé en cas de photoactivation des PS.

Dans la lignée cellulaire LNCaP, les résultats de WB révèlent l'apparition du fragment clivé de la protéine PARP en présence des PS seuls. Néanmoins, aucune diminution de l'expression de sa forme native n'est détectée. La protéine PARP reste donc bien active. Enfin, en cas de photoactivation des PS, l'expression de la forme native de PARP est inhibée et la bande correspondant au fragment clivé est toujours visible. Il semble donc que la protéine PARP soit clivée et donc inactivée en cas de photoactivation des 2 PS à 24 et 48h après irradiation (**Figure R-25**).

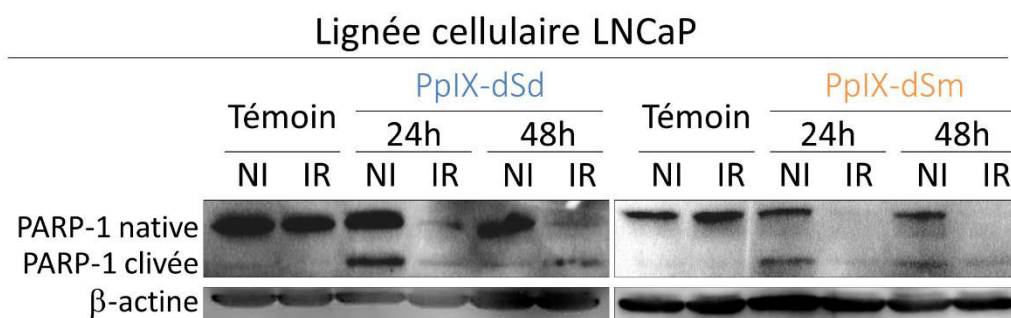


Figure R- 25 – Effets des photosensibilisateurs sur le clivage de PARP-1 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP.

Les cellules LNCaP sont traitées par la PpIX-dSd ou la PpIX-dSm puis irradiées (IR) ou non (NI) par la lumière rouge. L'inactivation de PARP-1 est étudiée par western-blot par visualisation de son fragment clivé en cas de photoactivation des PS.



I.4.4. Induction de la fragmentation de l'ADN

L'activation des caspases effectrices, et notamment de la caspase 3, induit l'activation d'endonucléases qui vont cliver l'ADN en fragments oligonucléosomiques d'environ 180-200 paires de bases. La fragmentation de l'ADN permet la quantification de l'apoptose par rapport au taux de ces fragments dans les cellules témoins.

Dans un premier temps, le taux de fragmentation de l'ADN a été quantifié grâce au kit « Cell Death Detection ELISA^{PLUS} » (Roche Diagnostics) 24 et 48h après la photoactivation de la PpIX-dSd ou de la PpIX-dSm dans les cellules prostatiques humaines. Dans un second temps, ce taux de fragmentation de l'ADN a également été analysé suite à la combinaison NAC-PDT afin de conclure quant au rôle des ROS dans cette induction du processus apoptotique.

Concernant les trois lignées cancéreuses prostatiques humaines PC-3, DU 145 et LNCaP, la lumière rouge seule et les PS seuls n'ont pas d'influence sur le contenu en ADN. En revanche, la photoactivation des PS, la PpIX-dSd ou la PpIX-dSm, induit la fragmentation de l'ADN au temps 24h, fragmentation retrouvée également à 48h.

Néanmoins, lorsque ce traitement par PDT est couplé à un inhibiteur de la production des ROS tel que la N-acétyl-cystéine, l'ADN reste intact, révélant ainsi l'implication des ROS dans la fragmentation de l'ADN induite par la PDT dans ces différentes lignées cellulaires.

Pour plus de précision, dans les cellules PC-3 traitées par la PpIX-dSd photoactivée par la lumière rouge, le taux de fragmentation d'ADN est de 4,6 à 24h en comparaison aux cellules témoins et est de 4,4 à 48h. Il en est de même pour les cellules PC-3 traitées cette fois-ci avec la PpIX-dSm photoactivée : le taux de fragmentation d'ADN est de 3,6 à 24h et de 3,2 à 48h. Pour ces mêmes conditions combinées avec la présence de NAC, le taux de fragmentation est semblable aux cellules témoins (1,1-1,2) (**Figure R-256**).

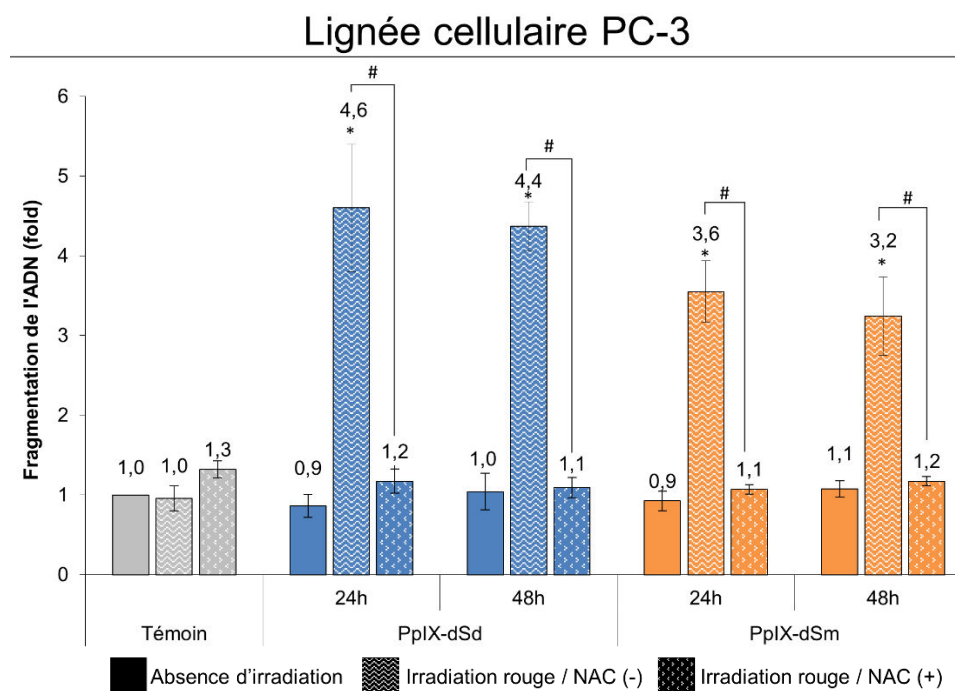


Figure R- 26 – Effets des photosensibilisateurs sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

La génération de fragments oligonucléosomiques est évaluée par un test ELISA 24 et 48h après traitement et irradiation ou non des cellules et/ou prétraitement avec la NAC, inhibiteur de la production des ROS.



Dans les cellules DU 145 traitées par la PpIX-dSd photoactivée par la lumière rouge, le taux de fragmentation d'ADN est de 4,6 à 24h en comparaison aux cellules témoins et diminue à 2,1 à 48h. Il en est de même pour les cellules PC-3 traitées cette fois-ci avec la PpIX-dSm photoactivée : le taux de fragmentation d'ADN est de 3,2 à 24h et de 2,7 à 48h. Dans ces cellules, la présence de NAC préserve les cellules de la fragmentation de l'ADN (taux similaire aux cellules témoins (0,8-1,3) (**Figure R-27**).

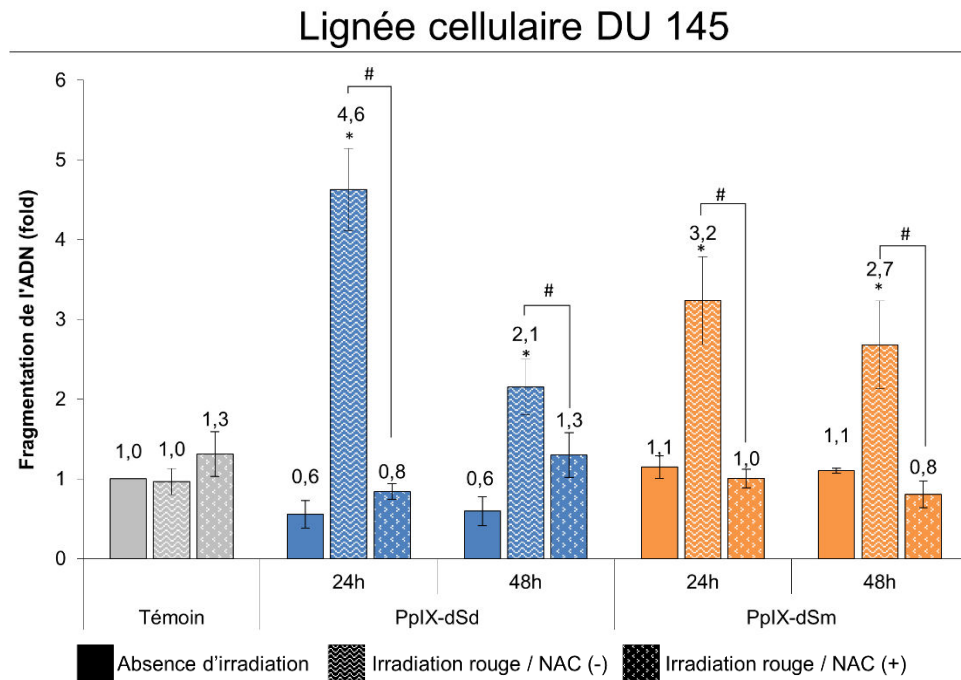


Figure R- 27 – Effets des photosensibilisateurs sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145.

La génération de fragments oligonucléosomiques est évaluée par un test ELISA 24 et 48h après traitement et irradiation ou non des cellules et/ou prétraitement avec la NAC, inhibiteur de la production des ROS.

Le taux de fragmentation d'ADN évalué pour l'ensemble de ces conditions, restent similaires d'une lignée à une autre lorsque les lignées cancéreuses prostatiques humaines androgéno-indépendantes PC-3 et DU 145 sont traitées par la protoporphyrine IX polyaminée à son IC₅₀ et photoactivée par la lumière rouge.

Concernant la lignée cancéreuse prostatique humaine androgéno-dépendante LNCaP, la photoactivation des PS induit également la fragmentation de l'ADN de façon significative mais moindre en comparaison aux deux lignées cellulaires étudiées précédemment : fold de 1,8 et 1,6 pour la PpIX-dSd à 24 et 48h ; fold de 1,5 pour la PpIX-dSm à 24 et 48h. Néanmoins, une des caractéristiques communes à ces lignées est l'intégrité de l'ADN en cas d'inhibition de la production des ROS par la NAC (**Figure R-28**).



Lignée cellulaire LNCaP

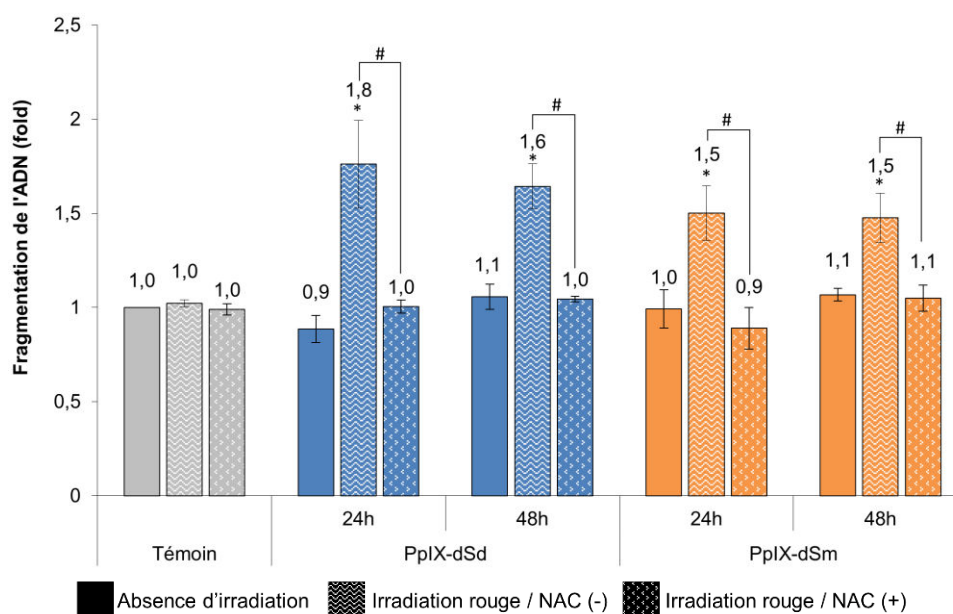


Figure R- 28 – Effets des photosensibilisateurs sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP.

La génération de fragments oligonucléosomiques est évaluée par un test ELISA 24 et 48h après traitement et irradiation ou non des cellules et/ou prétraitement avec la NAC, inhibiteur de la production des ROS.

Cette quantification du taux de fragmentation de l'ADN a également été effectuée suite à la photoactivation de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm dans les cellules prostatiques humaines saines RWPE-1. Dans cette lignée, deux concentrations de PS différentes sont utilisées : l'une correspondant à l'IC₅₀ de la lignée RWPE-1 calculée précédemment grâce aux tests de viabilité cellulaire (145 ng/mL pour la PpIX-dSd et 132 ng/ml pour la PpIX-dSm), l'autre, plus faible, correspondant à l'IC₅₀ de la lignée PC-3 (94 ng/mL pour la PpIX-dSd et 73 ng/mL pour la PpIX-dSm). En effet, la lignée PC-3 est la lignée cancéreuse prostatique humaine la plus résistante à la PDT du fait de son IC₅₀ plus importante que celles des lignées DU 145 et LNCaP. Ainsi, l'utilisation de cette dernière concentration permettra de conclure quant aux effets des PS sur les cellules saines lorsqu'ils sont utilisés à une dose prescrite pour détruire les cellules cancéreuses.

Ainsi, utilisés aux IC₅₀ des cellules RWPE-1, les PS n'ont pas d'effet sur l'intégrité de l'ADN en absence d'irradiation. Cependant, en cas de photoactivation, les PS induisent la fragmentation de l'ADN à des taux de l'ordre de 2,3 et 2,1 pour la PpIX-dSd à 24 et 48h et de l'ordre de 2,4 et 2,3 pour la PpIX-dSm à 24 et 48h. Pour les 2 PS, cette fragmentation de l'ADN est bien maintenue au cours du temps.

Enfin, en cas d'utilisation des PS à des doses plus faibles correspondant à l'IC₅₀ des cellules PC-3, le taux de fragmentation de l'ADN est plus faible (1,3-1,5 pour la PpIX-dSd et 1,2-1,6 pour la PpIX-dSm). Ainsi, à des doses utilisées pour induire la mort des cellules cancéreuses telles que les cellules PC-3, l'ADN des cellules saines telles que les cellules RWPE-1 garde son intégrité (**Figure R-29**).



Lignée cellulaire RWPE-1

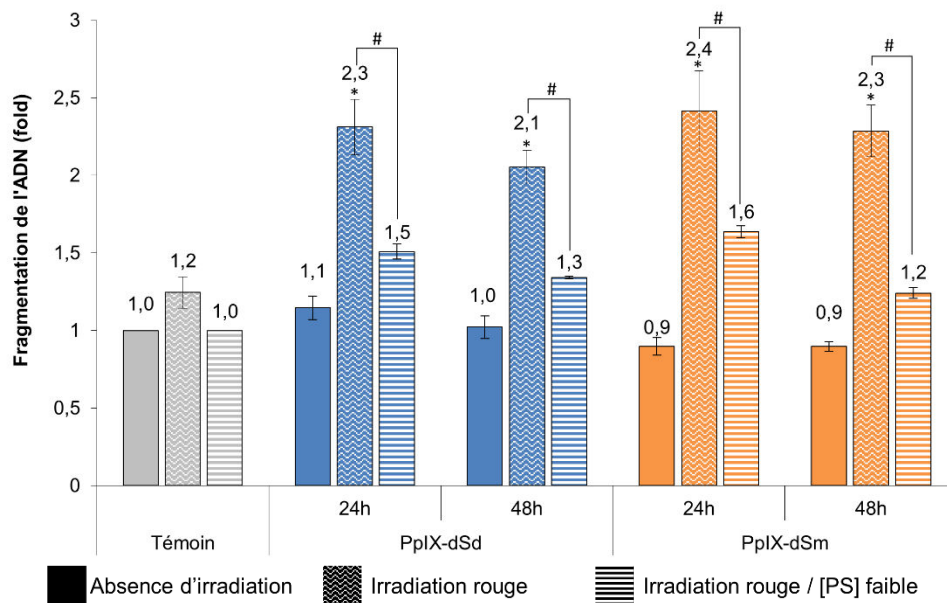


Figure R- 29 – Effets des photosensibilisateurs sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules prostatiques humaines saines RWPE-1.

La génération de fragments oligonucléosomiques est évaluée par un test ELISA 24 et 48h après traitement et irradiation ou non des cellules. Deux concentrations sont utilisées pour chaque PS : l' C_{50} déterminée pour les cellules RWPE-1 et l' IC_{50} déterminée pour la lignée PC-3.

Ainsi, l'ensemble de ces résultats a permis de mettre en évidence que la photoactivation par la lumière rouge des deux formes de la protoporphyrine IX-polyaminée est inductrice de la production de ROS à l'origine de la déstabilisation du potentiel membranaire mitochondrial, de l'activation de la caspase initiateur 9, de l'activation de la caspase effectrice 3, de l'inactivation de la protéine PARP-1 pour finalement induire la fragmentation de l'ADN et la mort des cellules cancéreuses prostatiques humaines par apoptose.



La lignée cellulaire PC-3 apparaissant comme étant la lignée la plus résistante aux traitements, les prochaines études ont porté intégralement sur cette lignée. D'autres voies de signalisation cellulaire qui sont activées ou inhibées après traitement ont été étudiées ainsi que des voies connues comme impliquées dans le phénomène de résistance à l'apoptose.

I.5. Protoporphyrine IX polyaminée et transduction du signal dans les cellules PC-3

I.5.1. Activation de la voie p38/MAPK

La voie p38/MAPK, reconnue comme une voie pro-apoptotique mais également comme régulateur positif de la voie COX-2/PGE₂, est souvent activée dans le cadre de la PDT. Son activation est étudiée grâce à l'utilisation d'un kit ELISA permettant de quantifier sa forme phosphorylée, qui est sa forme active, aux temps 5 min, 20 min, 1h, 3h, 6h, 12h, 24h et 48h.

Le traitement avec les PS seuls n'a aucun effet significatif sur l'activation de la voie p38/MAPK. En revanche, une fois photoactivée par la lumière rouge, la PpIX-dSd induit une activation de p38 dès 20 min après l'irradiation, mais cette activation est transitoire, puisqu'elle décroît après 6h pour de nouveau augmenter à partir de 12h. De la même façon, la PpIX-dSm photoactivée par la lumière rouge, induit l'activation de p38 à partir de 5 min pour décroître après 12h et de nouveau être augmentée à 48h (**Figure R-30**).

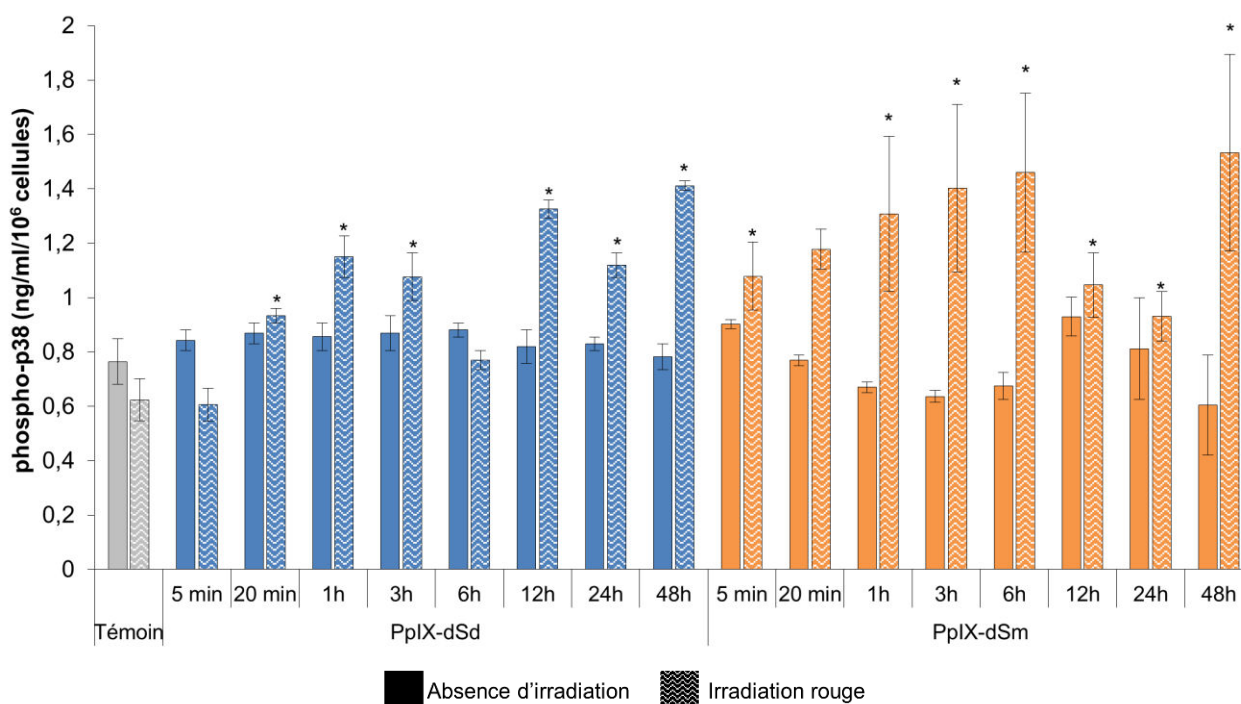


Figure R- 30 – Effets des photosensibilisateurs sur l'activation de la voie p38/MAPK dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

L'activation de p38 est évaluée par quantification ELISA des formes phosphorylées actives de p38. Les PS seuls (absence d'irradiation) n'ont pas d'effet sur l'activation de la voie p38, mais une fois activés par la lumière rouge, ils induisent une activation de p38.



L'activation transitoire de la voie p38 est largement décrite au cours de la transduction du message apoptotique dans le cadre de la PDT. La photoactivation de la PpIX polyaminée induit ce phénomène dans la lignée cancéreuse prostatique humaine PC-3, suggérant l'activation d'une signalisation apoptotique.

Par la suite, d'autres voies de signalisation, cette fois-ci connues comme impliquées dans la survie cellulaire, ont été étudiées sous l'action des 2 PS photoactivés ou non par la lumière rouge.

I.5.2. Inhibition de la voie PI3K/Akt

La voie PI3K/Akt est quant à elle très largement décrite comme une voie impliquée dans la survie cellulaire, l'oncogenèse et la résistance aux agents chimiothérapeutiques. De nombreux inhibiteurs de la voie PI3K/Akt sont à l'étude dans le but de favoriser l'induction de l'apoptose dans les cellules cancéreuses.

L'étude de la forme phosphorylée d'Akt par western blot a démontré que les PS non photoactivés n'avaient pas d'effet significatif sur cette voie Akt. En revanche, en cas de photoactivation par la lumière rouge, les 2 PS, PpIX-dSd et PpIX-dSm, induisent une inhibition de cette voie, inhibition démontrée par une inhibition de l'expression de la forme phosphorylée d'Akt 24 et 48h après l'irradiation (**Figure R-31**).

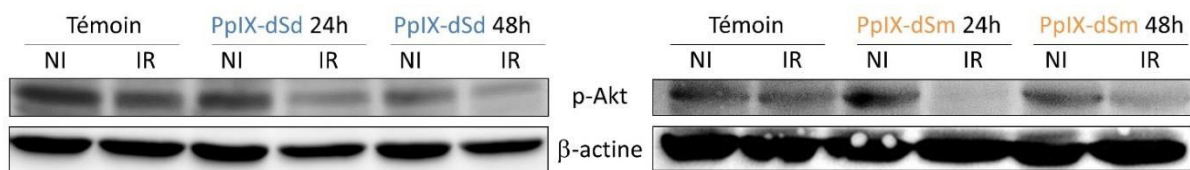


Figure R- 31 – Effets des photosensibilisateurs sur l'activation de la voie Akt dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

L'activation de la voie PI3K/Akt est étudiée par western blot avec un anticorps dirigé contre la forme d'Akt phosphorylée en sérine 473. La photoactivation des PS induit une diminution de l'activation d'Akt.

Ainsi, la photoactivation de la PpIX polyaminée, PpIX-dSd et PpIX-dSm, induit l'inhibition de la voie PI3K/Akt généralement impliquée dans la survie cellulaire. Cette voie ne sera donc pas impliquée dans un phénomène de résistance à l'apoptose et donc dans une résistance au traitement envisagé par PDT avec ces 2 PS.

L'activation d'un autre facteur, également impliqué dans la survie cellulaire, est étudiée en cas de photoactivation ou non des 2 PS : le facteur de transcription NF-κB.



I.5.3. Baisse de l'activation du facteur de survie NF-κB

Le facteur de transcription NF-κB est activé de manière constitutive dans divers cancers et notamment dans les cancers prostatiques. Il a été démontré que NF-κB intervient principalement dans l'oncogenèse en activant la transcription de facteurs impliqués dans la prolifération et l'inhibition de l'apoptose. L'activation de NF-κB se fait par translocation dans le noyau et fixation à l'ADN. Cette activation est évaluée par des techniques de retard sur gel.

Les cellules PC-3 sont traitées ou non avec l'un ou l'autre des PS, soumises ou non à une irradiation par la lumière rouge et une extraction des protéines nucléaires est effectuée sur des échantillons cellulaires 12, 24 et 48h après l'irradiation. Ces protéines nucléaires sont mises en présence d'une sonde marquée à la digoxigénine, et la fixation de NFκB sur cette sonde est évaluée par analyse de retard sur gel.

Cette étude permet de mettre en évidence que la lumière seule (Témoin/IR) et les PS seuls (PS/NI) n'ont pas d'effet sur l'activation du facteur de survie NF-κB. En revanche, une fois photoactivés, les 2 PS induisent une faible inhibition de l'activation de NF-κB dès 12h après l'irradiation, inhibition qui s'accroît à 24 et 48h (**Figure R-32**).

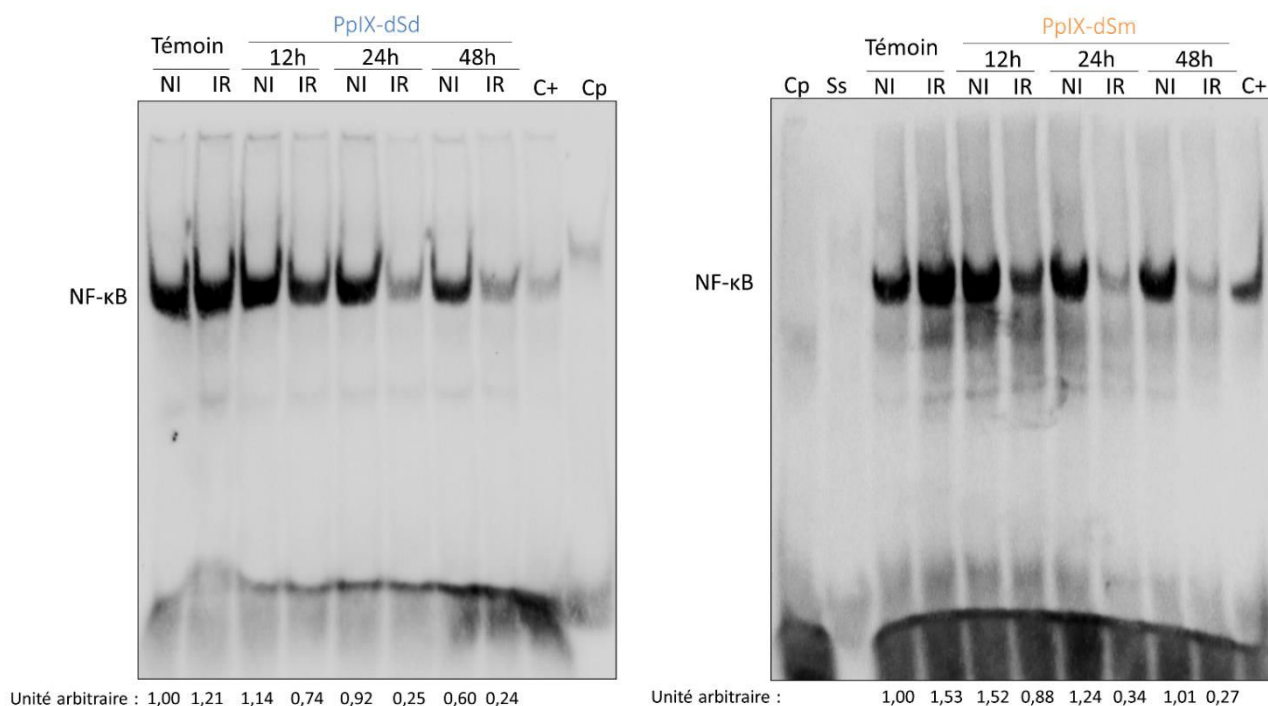


Figure R- 32 – Effets des photosensibilisateurs sur l'activation du facteur de survie NF-κB dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

Après une extraction des protéines nucléaires, la présence de NFκB actif est évaluée par retard sur gel après incubation en présence d'une sonde marquée à la digoxigénine. La photoactivation des PS induit une inhibition de l'activation de NF-κB.

Ainsi, la photoactivation de protoporphyrine IX polyaminée induit une activation de la voie pro-apoptotique p38/MAPK ainsi qu'une inhibition de deux voies de survie cellulaire qui sont la voie PI3K/Akt et le facteur de survie NF-κB. Ces résultats sont donc en corrélation avec le processus apoptotique mis en place par cette photoactivation.



I.6. Protoporphyrine IX polyaminée et voie de la cyclooxygénase-2

Le métabolisme de l'acide arachidonique est à l'origine de la synthèse des prostanoides par la voie métabolique des cyclooxygénases, notamment la cyclooxygénase-2 ou COX-2. Cette dernière a été démontrée comme impliquée dans de nombreux processus physiologiques mais aussi pathologiques tels que le cancer. Des études précédentes concernant le traitement par PDT de cellules cancéreuses ont démontré que la photoactivation d'un grand nombre de PS induit une augmentation de l'expression de la cyclooxygénase-2 (COX-2) et de son activité métabolique. Ainsi, les effets de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm sur la voie de la COX-2 ont été analysés dans la lignée cancéreuse prostatique humaine PC-3, 24 et 48h après une photoactivation des PS par la lumière rouge.

I.6.1. Activation de la voie COX-2/PGE₂

I.6.1.1. Augmentation de l'expression de COX-2

La cyclooxygénase-2 ou COX-2 est une glycoprotéine membranaire de 72 KDa. Il s'agit d'une enzyme, rapidement inductible par divers stimuli, impliqué dans la conversion de l'acide arachidonique en prostaglandines pro-inflammatoires. Le métabolite principal de la COX-2 est la prostaglandine E₂ ou PGE₂. L'expression de la COX-2 a été étudiée 24 et 48h après la photoactivation des PS dans les cellules PC-3 à l'aide d'un western blot. La production de PGE₂ a été dosée aux mêmes temps par un test ELISA quantitatif à partir du surnageant de culture des cellules traitées par PDT.

La lumière seule s'est révélée n'avoir aucun effet sur l'expression de COX-2 dans les cellules PC-3. C'est également le cas des PS non photoactivés pour les temps 24 et 48h (mis à part la PpIX-dSm qui induit déjà une diminution de l'expression de COX-2 sans photoactivation). En revanche, en cas de photoactivation par la lumière rouge, les 2 PS induisent une augmentation de l'expression de COX-2, 24 et 48h après leur photoactivation (**Figure R-33**).

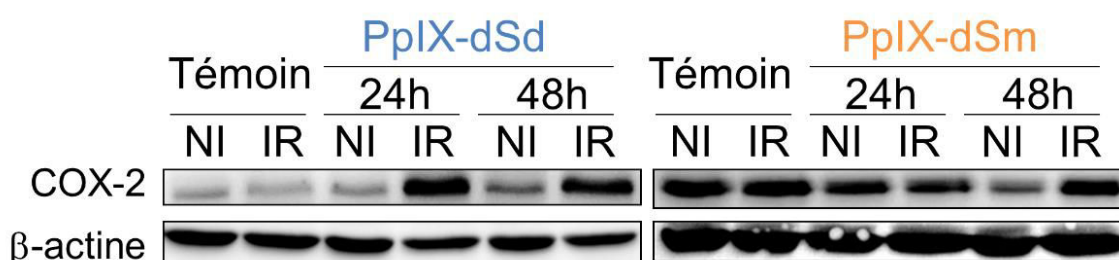


Figure R- 33 – Effets des photosensibilisateurs sur l'expression de COX-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

Le niveau d'expression de COX-2 est étudié par western-blot. La photoactivation des PS induit une augmentation de l'expression de COX-2 aux temps 24 et 48h.



I.6.1.2. Augmentation de l'activité de COX-2

Le dosage de la PGE₂ dans les surnageants de culture révèle que la lumière seule et les PS seuls n'induisent pas de variation de la quantité de PGE₂. Au contraire, en cas de photoactivation, la PpIX-dSd induit une augmentation significative (de l'ordre de 3) du taux de PGE₂ aux temps 24 et 48h. Il en est de même pour la PpIX-dSm photoactivée qui induit une augmentation de la quantité de PGE₂ de l'ordre de 4 à 24h et de 2,5 à 48h (**Figure R-34**).

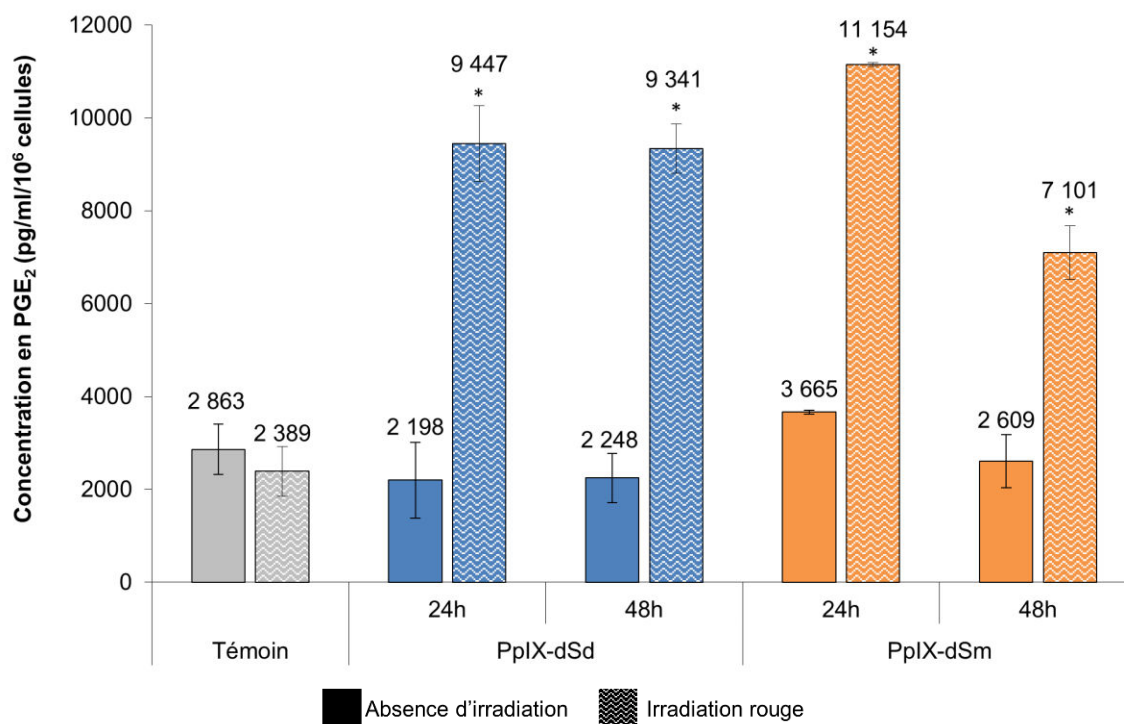


Figure R- 34 – Effets des photosensibilisateurs sur l'activité de COX-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

La production de PGE₂, le métabolite principal de COX-2, est quantifiée à l'aide d'un kit ELISA. La photoactivation des PS induit une augmentation de la production de PGE₂ aux temps 24 et 48h.

Ces résultats de dosage de la PGE₂ sont en adéquation avec les résultats obtenus lors de l'analyse de l'expression de la COX-2 par western-blot. Ainsi, c'est uniquement en cas de photoactivation que nos 2 PS d'intérêt induisent une augmentation de l'expression et de l'activité de la COX-2.

Cette voie de la COX-2 étant souvent connue comme inductrice d'une résistance à l'apoptose, plusieurs techniques d'inhibition de cette voie ont été utilisées afin d'étudier son implication dans un éventuel phénomène de résistance à l'apoptose dans notre modèle.



I.6.2. Absence d'implication de la voie COX-2/PGE₂ dans une résistance à l'apoptose

I.6.2.1. Inhibition chimique de l'activité de COX-2 et ses effets sur l'apoptose dans la lignée cellulaire PC-3

L'implication de la COX-2 dans un phénomène de résistance à l'apoptose et donc au traitement ayant largement été démontrée, la recherche tend à développer divers inhibiteurs de cette enzyme. Dans cette étude, un inhibiteur de l'activité de COX-2 a été utilisé : le NS-398 (N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl]-methanesulfonamide). Les effets de ce dernier sur l'expression et l'activité de COX-2 ont été confirmés et ses effets sur le processus apoptotique ont été étudiés, notamment sur la fragmentation de l'ADN.

Tout d'abord, l'effet du NS-398 sur l'activité de la COX-2 a été validé. En effet, pour toutes les conditions étudiées (cellules PC-3 traitées par l'un ou l'autre des PS photoactivés par la lumière rouge), un prétraitement de 2h avec le NS-398 inhibe la production de PGE₂ qui avait été activée par la photoactivation des PS. Le NS-398 apparaît bien comme un inhibiteur de l'activité de la COX-2 (**Figure R-35**).

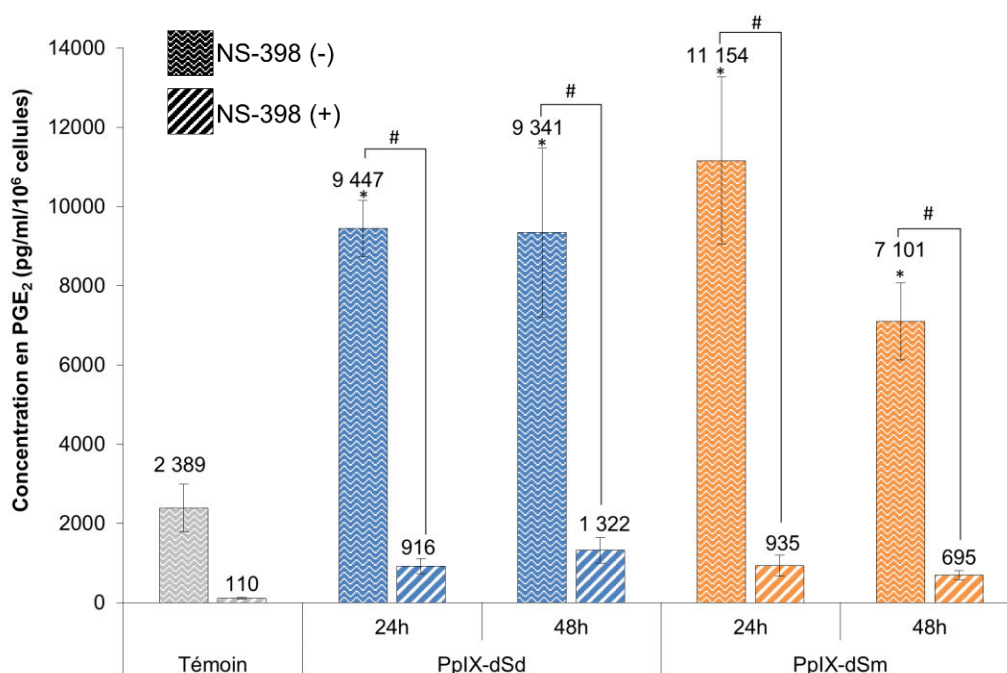


Figure R- 35 – Effets du NS-398 sur l'activité de COX-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

La production de PGE₂, le métabolite principal de COX-2, est quantifiée à l'aide d'un kit ELISA. La présence de NS-398 annule l'augmentation de la production de PGE₂ induite par la photoactivation des PS.

Enfin, le taux de fragmentation de l'ADN a été analysé dans ces mêmes conditions afin de conclure quant au rôle éventuel de l'activité de COX-2 dans un phénomène de résistance à l'apoptose. Si tel était le cas, l'inhibition de la production de PGE₂ par le NS-398 induirait une augmentation du taux de fragmentation de l'ADN.



En cas de photoactivation de la PpIX-dSd, le prétraitement de 2h avec le NS-398 n'induit pas de différence significative sur le taux de fragmentation de l'ADN à 24h (fold de 4,7 contre 4,6 pour les témoins) et à 48h (fold de 4,5 contre 4,4 pour les témoins). Des résultats similaires sont retrouvés en cas de photoactivation de la PpIX-dSm : aucune différence significative de taux de fragmentation de l'ADN n'est retrouvée en présence de NS-398 à 24h (fold de 3,6 identique aux témoins) et à 48h (fold de 3,4 contre 3,2 pour les témoins) (**Figure R-36**).

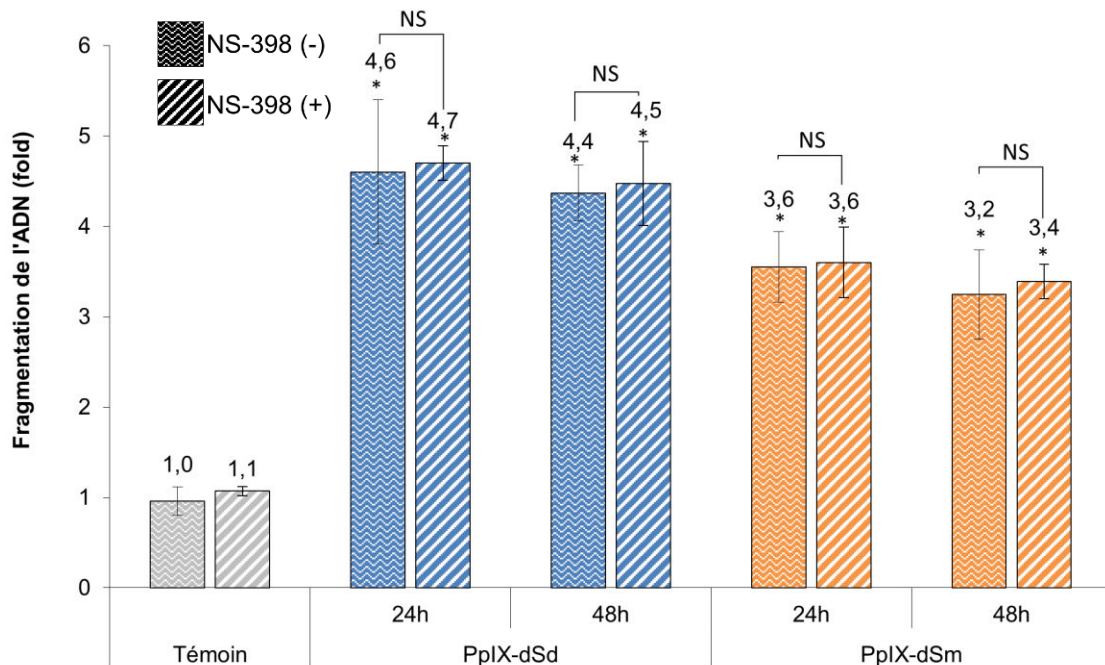


Figure R- 36 – Effets du NS-398 sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

La génération de fragments oligonucléosomiques est évaluée par un test ELISA 24 et 48h après traitement et irradiation des cellules ayant subi un prétraitement ou non avec le NS-398. La présence de l'inhibiteur de l'activité de COX-2 n'a pas d'effet sur la fragmentation d'ADN induite par la photoactivation des PS.

Il semblerait donc que la COX-2, par son activité, ne soit pas impliquée dans un phénomène de résistance à l'apoptose.

Néanmoins, c'est parfois par son expression et non son activité que la COX-2 peut entrainer une résistance au traitement. Ainsi, une inhibition de l'expression de COX-2 par l'utilisation de shRNA a été développée en vue d'étudier les effets de cette inhibition sur l'apoptose.



I.6.2.2. Inhibition de l'expression de COX-2 par transfection de shRNA dans la lignée cellulaire PC-3

I.6.2.2.1. Acquisition d'une lignée cellulaire PC-3 déficiente pour COX-2

La Lipofectamine® contient des sous-unités lipidiques capables de former des liposomes dans un milieu aqueux, ce qui permet de piéger les plasmides d'ADN. Il s'agit d'un liposome cationique qui après avoir formé un complexe avec les acides nucléiques chargés négativement leur permet de surmonter la répulsion électrostatique de la membrane cellulaire, de fusionner avec celle-ci pour atteindre le cytoplasme. Aussi, la Lipofectamine® améliore l'efficacité de la transfection en favorisant la pénétration du matériel génétique transfecté dans l'enveloppe nucléaire tout en la gardant intacte.

De ce fait, les cellules PC-3 sontensemencées 24h dans des plaques 6 puits à une densité de 1.10^6 cellules/mL. Un mélange Lipofectamine®/shRNA est effectué dans du milieu OPTI-MEM suivi d'une incubation de 10 min à température ambiante. Ce mix est ajouté au milieu contenant les cellules. Après 2-3 jours, les cellules sont soumises à une sélection par un antibiotique, la puromycine (5 µg/mL) durant 14 jours. Enfin, une dilution limite est effectuée en vue d'acquérir une lignée stable provenant d'un même clone. Pour cela, les cellules sélectionnées sontensemencées en plaque 96 puits à une densité de 1 cellule par puits. Après 24h, les puits ne comportant qu'une seule cellule sont identifiés et l'amplification de ces clones peut avoir lieu. Une seule population a pu être isolée : F3.

L'expression de COX-2 dans cette population a été analysée par western-blot. La transfection à l'aide de shRNA a bien permis d'inhiber l'expression de COX-2 dans les cellules PC-3 (Figure R-37).

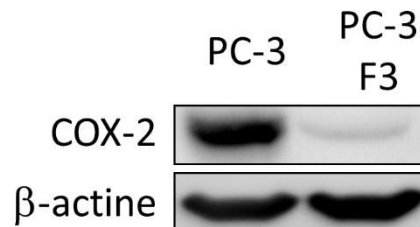


Figure R- 37 – Effets de la transfection de shRNA COX-2 sur l'expression de COX-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

Le niveau d'expression de COX-2 est évalué par western blot. La transfection stable de shRNA a permis de diminuer l'expression de COX-2 dans les cellules PC-3.

Cette lignée cellulaire PC-3 F3 (COX-2 -) permettra donc d'étudier le rôle de COX-2 dans un phénomène de résistance à l'apoptose dans le cadre de la PDT.



I.6.2.2.2. Etude des effets de l'inhibition de l'expression de COX-2 sur le taux de fragmentation de l'ADN dans la lignée cellulaire PC-3

Le taux de fragmentation de l'ADN a été analysé dans ces mêmes conditions afin de conclure quant au rôle éventuel de l'expression de COX-2 dans un phénomène de résistance à l'apoptose.

La lignée PC-3 F3 (COX-2 -) est soumise au traitement par la PpIX-dSd ou PpIX-dSm suivi de leur photoactivation par la lumière rouge. Le taux de fragmentation de l'ADN est étudié 24 et 48 h après l'irradiation et comparé aux taux obtenus pour la lignée PC-3 dans ces mêmes conditions. Dans le cas où COX-2 induirait une résistance à l'apoptose de par son expression, l'inhibition de celle-ci dans la lignée PC-3 F3 (COX-2 -) induirait une augmentation du taux de fragmentation de l'ADN.

En cas de photoactivation de la PpIX-dSd, aucune différence significative sur le taux de fragmentation de l'ADN n'est révélée entre les 2 populations de PC-3 : un fold de 4,8 pour les cellules PC-3 F3 (COX-2 -) contre 4,6 pour les PC-3 à 24h et un fold de 3,7 contre 4,4 à 48h. Des résultats similaires sont retrouvés en cas de photoactivation de la PpIX-dSm : aucune différence significative de taux de fragmentation de l'ADN n'est retrouvée à 24h (fold de 3,5 contre 3,6) et à 48h (fold de 3,9 contre 3,2 pour les témoins) (**Figure R-38**).

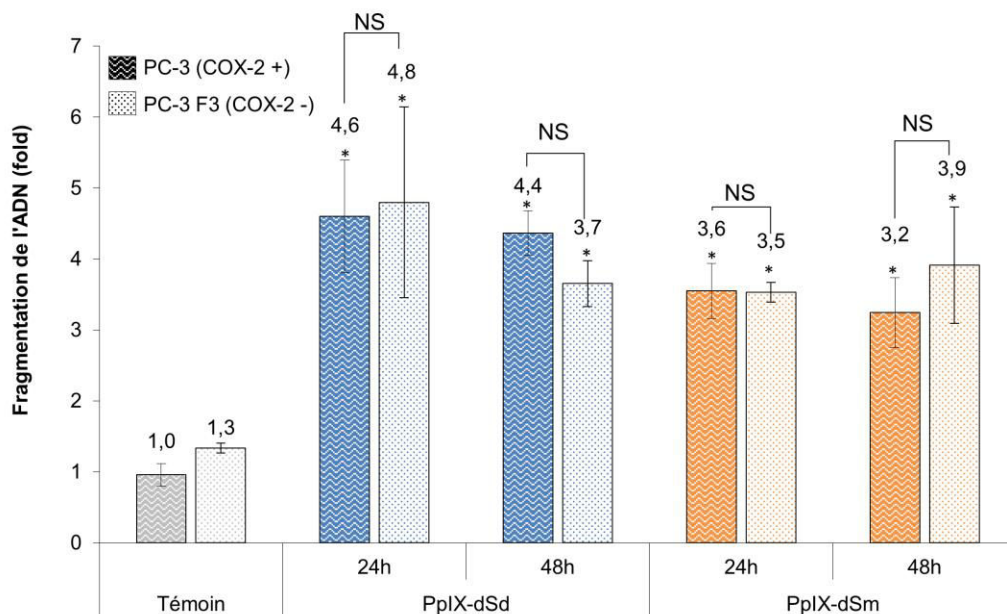


Figure R- 38 – Effets de la transfection de shRNA COX-2 sur le taux de fragmentation de l'ADN dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

La génération de fragments oligonucléosomiques est évaluée par un test ELISA 24 et 48h après traitement et irradiation des cellules PC-3 et les cellules PC-3 F3 (COX-2-). L'inhibition de l'expression de COX-2 n'a pas d'effet sur la fragmentation d'ADN induite par la photoactivation des PS.

Ainsi, l'absence d'augmentation du taux de fragmentation d'ADN en cas d'inhibition de l'expression de COX-2 dans les cellules PC-3 révèle que la COX-2, de par son expression ou son activité, n'apparaît pas comme inductrice d'une résistance à l'apoptose dans notre modèle.



I.6.2.3. Augmentation de l'expression de COX-2 par transfection d'ADN complémentaires (ADNc) dans la lignée cellulaire DU 145

Afin de conclure quant à l'absence d'implication de COX-2 dans une résistance à l'apoptose et de démontrer que ce phénomène n'est pas lignée-dépendant, la lignée DU 145 exprimant un niveau basal très faible de COX-2 est transfectée à l'aide d'ADNc COX-2 en vue d'augmenter le niveau d'expression de COX-2 dans cette lignée et de conclure quant à son rôle sur l'apoptose.

I.6.2.3.1. Acquisition d'une lignée cellulaire DU 145 exprimant constitutivement COX-2

En utilisant le même protocole que pour la lignée cellulaire PC-3, la lignée DU 145 est sujette à une transfection d'ADNc COX-2 par l'utilisation de Lipofectamine® suivie d'une sélection par un antibiotique, G418. La dilution limite a permis d'isoler 7 populations (B3, C6, D2, E7, F4, G10, G11) pour lesquelles l'expression de la COX-2 a été étudiée par western-blot.

En comparaison aux cellules témoins non transfectées, l'ensemble des populations isolées montrent une augmentation de l'expression de COX-2, ceci de façon plus ou moins importante (**Figure R-98**).

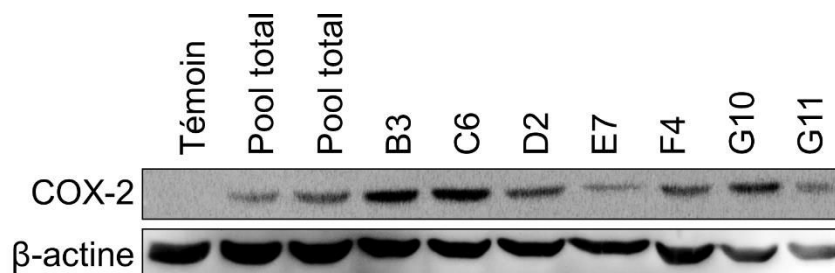


Figure R- 39 – Effets de la transfection d'ADN complémentaire COX-2 sur l'expression de COX-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145.

L'expression de COX-2 est évaluée par western-blot dans les différentes lignées DU 145 transfectées. La transfection d'ADNc COX-2 induit une augmentation de l'expression de COX-2 dans la lignée DU 145.

Ces résultats ont permis de sélectionner trois populations exprimant différents niveaux d'expression de COX-2 : B3, C6 et D2. Par la suite, un traitement de ces différentes populations par la diosgénine (10 μ M) est effectué. Il s'agit d'un stéroïde végétal étudié au sein du laboratoire, dont les capacités d'induire une augmentation de l'expression de COX-2 sont déjà connues. Un western-blot a permis d'analyser les différents niveaux d'augmentation d'expression de COX-2 de ces trois populations.

Il semblerait que la population D2 soit la population pour laquelle la différence de niveau d'expression de COX-2 suite au traitement est la plus significative (**Figure R-40**).



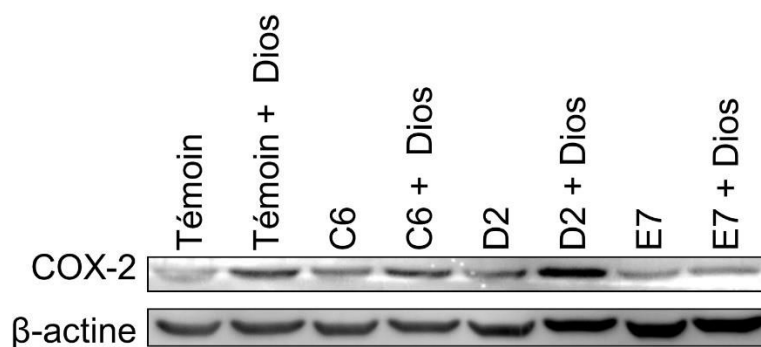


Figure R- 40 – Effets de la diosgénine sur l’expression de COX-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145 transfectées (COX-2 +)

L’expression de COX-2 est évaluée par western-blot dans les différentes lignées DU 145 transfectées traitées par la diosgénine. La diosgénine induit une augmentation de l’expression de COX-2 dans les lignées DU 145 (COX-2 +) C6, D2 et E7, avec un effet plus important pour la lignée D2.

Cette lignée DU 145 D2 (COX-2+) sera la population sélectionnée pour étudier le rôle de COX-2 dans un phénomène de résistance à l’apoptose dans le cadre de la PDT.



I.6.2.3.2. Etude des effets de l'augmentation du niveau d'expression de COX-2 dans la lignée DU 145 sur le taux de fragmentation de l'ADN

La lignée DU 145 D2 (COX-2+) est soumise au traitement par la PpIX-dSd ou PpIX-dSm suivi de leur photoactivation par la lumière rouge. Le taux de fragmentation de l'ADN est étudié 24 et 48 h après l'irradiation et comparé aux taux obtenus pour la lignée DU 145 dans ces mêmes conditions. Dans le cas où COX-2 induirait une résistance à l'apoptose, l'augmentation du niveau d'expression de celle-ci induirait une diminution du taux de fragmentation de l'ADN.

En cas de photoactivation de la PpIX-dSd, aucune différence significative sur le taux de fragmentation de l'ADN n'est révélée entre les 2 populations de cellules DU 145 : un fold de 5,4 pour les cellules DU 145 D2 (COX-2 +) contre 4,6 pour les cellules DU 145 à 24h et un fold de 3,5 contre 2,1 à 48h. Des résultats similaires sont retrouvés en cas de photoactivation de la PpIX-dSm : aucune différence significative de taux de fragmentation de l'ADN n'est retrouvée à 24h (fold de 3,6 contre 3,2) et à 48h (fold de 4,0 contre 2,7 pour les témoins) (Figure R-41).

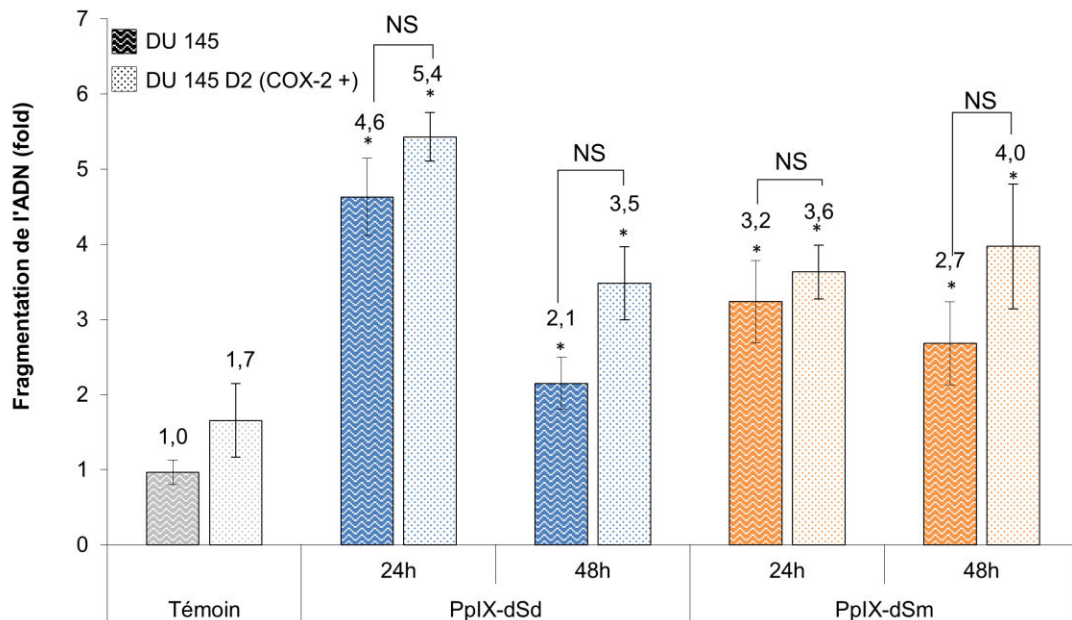


Figure R- 41 – Effets de la transfection d'ADNc COX-2 sur le taux de fragmentation de l'ADN dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145.

La génération de fragments oligonucléosomiques est évaluée par un test ELISA 24 et 48h après traitement et irradiation des cellules DU 145 et les cellules DU 145 D2 (COX-2+). L'augmentation de l'expression de COX-2 n'a pas d'effet sur la fragmentation d'ADN induite par la photoactivation des PS.

Ainsi, cette absence de diminution du taux de fragmentation de l'ADN lorsque le niveau d'expression de COX-2 est augmenté dans les cellules DU 145 révèle que la COX-2 ne joue aucun rôle sur le déroulement du processus apoptotique.

L'ensemble de ces données démontrent que l'activation de la voie COX-2/PGE₂ en cas de photoactivation de la PpIX-dSd ou de la PpIX-dSm n'est pas à l'origine d'une résistance au traitement dans notre modèle, ce qui permet d'affirmer que les deux PS induisent leur effet maximal sans nécessité de coupler ce traitement de PDT avec un inhibiteur de la voie COX-2/PGE₂ comme c'est le cas pour de nombreux autres PS.



Les régulateurs principaux de la COX-2 sont le facteur de survie NF- κ B et la voie pro-apoptotique p38/MAPK. NF- κ B étant connu comme un régulateur positif de COX-2, l'inhibition de son activation démontrée en cas de photoactivation des 2 PS ne peut donc être corrélée à l'activation de la voie COX-2 retrouvée dans ces mêmes conditions. En revanche, les 2 PS photoactivés induisent une activation de la voie p38/MAPK également connue comme régulateur positif de COX-2. Ainsi, de ces 2 régulateurs principaux, seule la voie p38/MAPK se présente comme éventuel régulateur de COX-2 dans notre modèle.

I.6.3. Implication de p38 dans la signalisation de l'apoptose et la voie de COX-2

Afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle la voie p38/MAPK régulerait l'apoptose et/ou la voie COX-2/PGE₂ dans notre modèle, un inhibiteur de la voie p38/MAPK, le SB203580, est étudié quant à ses effets sur l'expression de COX-2 et ceci par western-blot. Ainsi, les cellules PC-3 subissent un prétraitement de 2h au SB203580 (10 μ M) avant d'être sujettes aux PS et leur photoactivation.

L'inhibition de la voie p38/MAPK par l'utilisation du SB203580 induit une diminution de l'expression de COX-2 et plus exactement annule l'augmentation de l'expression de COX-2 induite par la photoactivation des PS. Dans ces mêmes conditions, la production du métabolite principal de COX-2, la PGE₂, a pu être quantifiée. En corrélation avec les résultats précédents, la quantité de PGE₂ est diminuée en présence de SB203580 pour les deux PS, 24 et 48h après l'irradiation. En effet, en présence de SB203580, le taux de PGE₂ devient moins important que dans les cellules témoins (2389 pg/mL/10⁶ cellules) avec une concentration inférieure à 230 pg/mL/10⁶ cellules (**Figure R-42**).

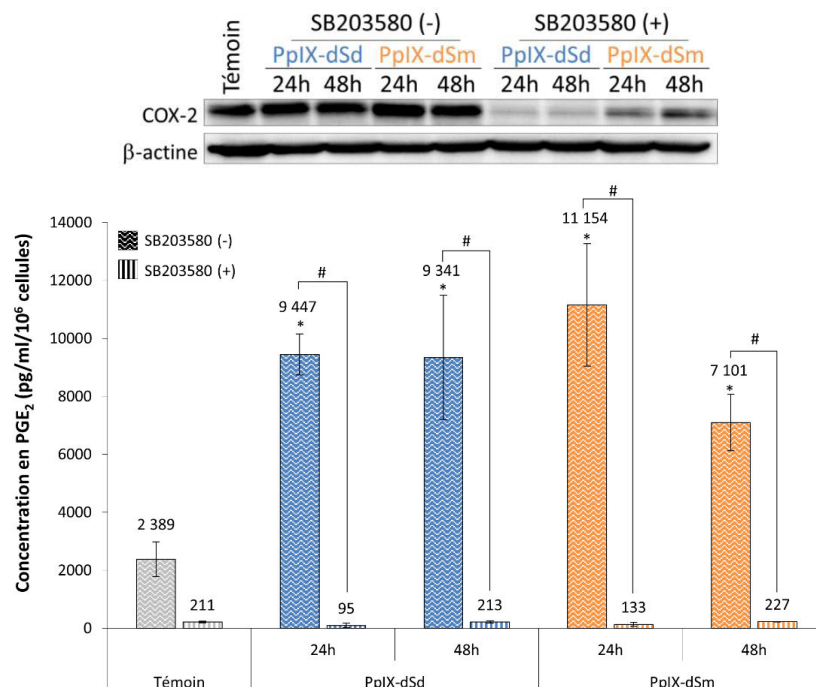


Figure R- 42 – Effets du SB203580 sur l'expression et l'activité de COX-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

L'expression de COX-2 est étudiée par western-blot et la production de PGE₂, le métabolite principal de COX-2, est quantifiée à l'aide d'un kit ELISA. La présence de SB203580, un inhibiteur de la voie p38/MAPK, induit une inhibition de la voie COX-2/PGE₂ activée par la photoactivation des PS.



Il apparaît donc que la photoactivation des 2 PS induit à la fois une initiation du processus apoptotique et une activation de la voie COX-2/PGE₂ via la voie p38/MAPK.

Une quantification du taux de fragmentation de l'ADN a également été évaluée suite à ce prétraitement au SB203580 couplé à la photoactivation de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm.

Pour l'ensemble des conditions, la présence de SB203580 contrecarre l'induction de la fragmentation de l'ADN induite en cas de photoactivation des 2 PS aux temps 24 et 48h. En effet, concernant les cellules traitées par la PpIX-dSd, le taux de fragmentation de l'ADN est de 4,6 contre 2,3 en présence de SB203580 au temps 24h, et de 4,4 contre 2,4 au temps 48h. Concernant les cellules traitées par la PpIX-dSm, le taux de fragmentation de l'ADN est de 3,6 à 24h contre 1,4 en présence de SB203580 et de 3,2 contre 2,6 à 48h (**Figure R-43**).

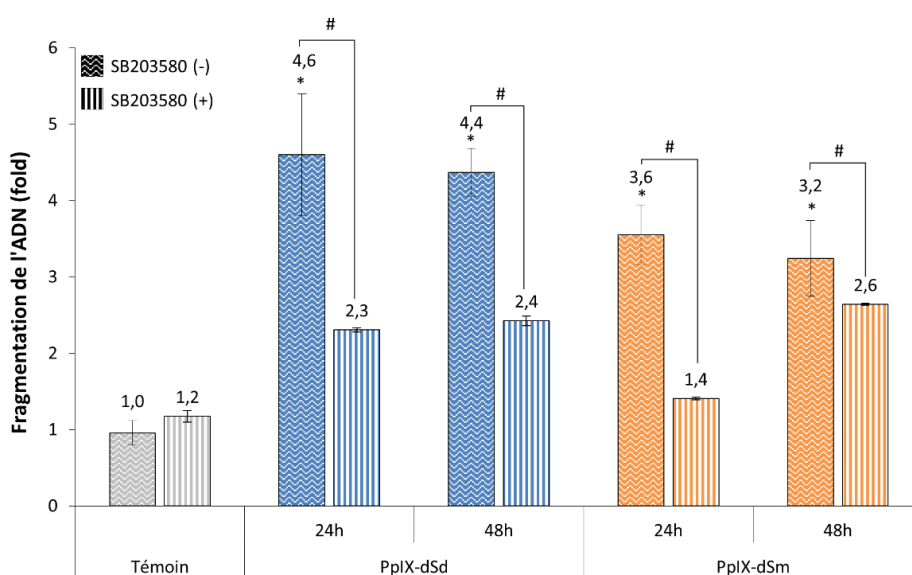


Figure R- 43 – Effets du SB203580 sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

La génération de fragments oligonucléosomiques est évaluée par un test ELISA 24 et 48h après traitement et irradiation des cellules ayant subi un prétraitement ou non avec le SB203580. L'inhibition de la voie p38/MAPK induit une diminution du taux de la fragmentation d'ADN induite par la photoactivation des PS.

Ces résultats permettent de conclure quant à l'absence d'implication de COX-2 dans une résistance à l'apoptose puisque l'inhibition indirecte de la voie COX-2/PGE₂ via l'inhibition de son régulateur principal, la voie p38/MAPK, n'induit pas d'augmentation du taux de fragmentation de l'ADN. Au contraire, le taux de fragmentation de l'ADN se retrouvant diminué en cas d'inhibition de p38 révèle que la voie p38/MAPK joue bien un rôle de voie pro-apoptotique dans notre modèle.

Il apparaît donc que la photoactivation des deux PS d'intérêt dans les lignées cancéreuses prostatiques humaines induit une signalisation via p38 MAPK impliquée à la fois dans une initiation du processus apoptotique et une activation de la voie COX-2/PGE₂ elle-même non inductrice d'une résistance à l'apoptose observée.



Dans le cadre de la PDT, d'autres voies, autres que la voie COX-2/PGE₂, peuvent être à l'origine d'une résistance au processus apoptotique ; c'est notamment le cas de la voie autophagique. C'est pour cela que les effets des deux PS d'intérêt sur l'autophagie et ses régulateurs ont été étudiés.

I.7. Protoporphyrine IX et autophagie

A un niveau basal, l'autophagie permet le maintien de l'homéostasie cellulaire en recyclant le contenu cytoplasmique. Elle peut être stimulée en conditions de stress afin de favoriser la survie cellulaire. C'est notamment le cas lors de thérapie anticancéreuse. En effet, le processus autophagique peut être stimulé afin de résister à l'apoptose induit par les traitements anticancéreux.

I.7.1. Variations de l'expression des acteurs de la voie autophagique dans la lignée cellulaire PC-3

Afin d'étudier une éventuelle stimulation de l'autophagie dans notre modèle thérapeutique, les cellules PC-3 ont étéensemencées à la densité déterminée, traitées 24h avec la protoporphyrine IX polyaminée pour ensuite être irradiées ou non à la lumière rouge. L'expression des différents acteurs autophagiques est étudiée par western-blot sur des extraits protéiques totaux de cellules récupérées 24 et 48h après la photoactivation des PS. Les différentes étapes de l'autophagie sont étudiées selon les niveaux d'expression de leurs acteurs principaux : le niveau d'expression de la protéine Bécline-1 correspond à la phase d'initiation, la phase d'élongation est étudiée grâce aux protéines ATG5, ATG12 et ATG16L alors que la phase de fusion avec le lysosome est étudiée grâce aux protéines ATG3 et ATG7 et grâce à la conversion de LC3-I en LC3-II.

Dans la lignée cellulaire PC-3, la lumière seule et les PS seuls n'ont aucun effet sur l'expression des acteurs autophagiques tels que Bécline-1, les protéines ATG et la protéine LC3.

En revanche, selon la protéine concernée, la photoactivation des PS induit différents niveaux de variations d'expression des acteurs autophagiques. En effet, concernant la phase d'initiation, les 2 PS ont très peu d'effet sur l'expression de la protéine Bécline-1 que ce soit à 24 ou 48h. Concernant les acteurs clés de la phase d'élongation, les PS photoactivés induisent peu d'effet sur l'expression de la protéine ATG5 mais, en revanche, induisent une diminution de l'expression d'ATG12 et ATG16L aux temps 24 et 48h. Enfin, dans ces mêmes conditions, les protéines ATG7 et ATG3 voient leur niveau d'expression diminuer alors que la conversion de LC3-I en LC3-II est observable 24 et 48h après la photoactivation de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm (**Figure R-44**).



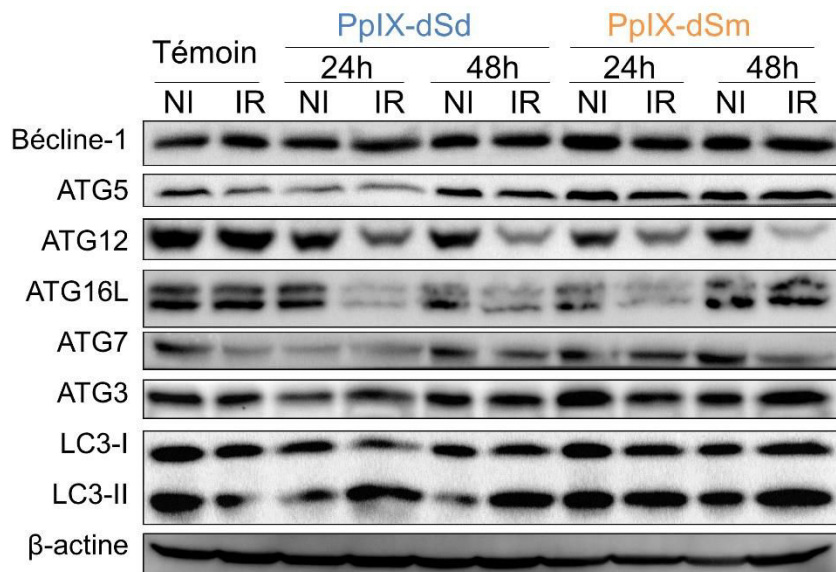


Figure R- 44 – Effets des photosensibilisateurs sur l’expression des acteurs autophagiques dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

L’expression des protéines impliquées dans l’initiation de l’autophagie (Bécline-1), l’élargissement de l’autophagosome (ATG5, ATG12 et ATG16L) et la fusion avec le lysosome (ATG3, ATG7, LC3-I et LC3-II) est étudiée par western-blot. La photoactivation des PS induit une diminution de l’expression de l’ensemble des acteurs autophagiques mais induit néanmoins la conversion de LC3-I en LC3-II.

Il apparaît donc que la photoactivation des PS induit une diminution des acteurs caractéristiques des phases précoces de l’autophagie alors que la conversion de LC3-I en LC3-II, marqueur de l’étape finale de l’autophagie, est bien activée.



Afin de mieux comprendre ces différences de variation d'expression des acteurs autophagiques, l'activation des régulateurs clés de l'autophagie est étudiée.

I.7.2. Activation de la voie mTOR

La voie majeure de régulation de l'autophagie est la signalisation mTOR, mTOR étant un régulateur négatif de l'autophagie. En phosphorylant Atg13, mTOR empêche la formation correcte du complexe ULK, inhibant ainsi le processus d'autophagie. L'activation de mTOR est étudiée par western-blot en évaluant le niveau d'expression de sa forme phosphorylée aux temps 24 et 48h.

Il est ainsi démontré que la photoactivation de la PpIX-dSd n'a pas ou peu d'effet sur l'expression de mTOR mais induit une augmentation de l'expression de la forme phosphorylée de mTOR, augmentation beaucoup plus marquée à 24h en comparaison à 48h. Il semble donc que la PpIX-dSd photoactivée induit l'activation de l'inhibiteur de l'autophagie qu'est mTOR (**Figure R-45**).

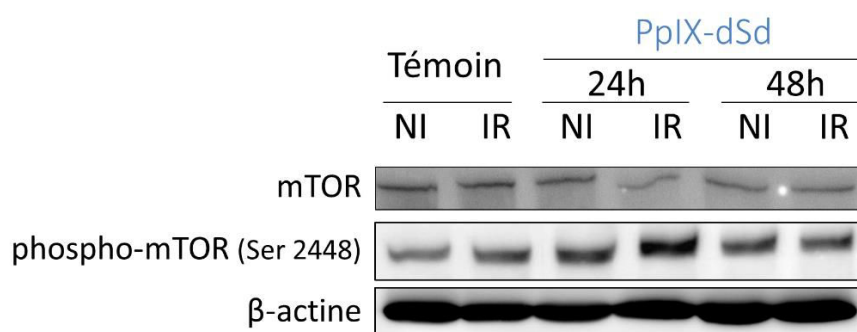


Figure R- 45 – Effets de la protoporphyrine IX dispersée sur l'activation de mTOR dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

L'activation de la voie mTOR est étudiée par western blot avec un anticorps dirigé contre la forme de mTOR phosphorylée en sérine 2448. La photoactivation des PS induit une augmentation de l'activation de mTOR.

Les régulateurs principaux de la signalisation mTOR sont le système LKB1/AMPK et la voie de survie PI3K/Akt. En effet, une phosphorylation activatrice de l'AMPK par LKB1 a la capacité d'inhiber mTOR soit directement (en phosphorylant Raptor) soit par phosphorylation et donc activation du complexe TSC1/2. En parallèle, ce complexe TSC1/2 peut être inhibé suite à l'activation de la voie Akt, entraînant ainsi l'activation de mTOR. Ces données permettent d'identifier la voie AMPK comme activatrice de TSC1/2 et la voie Akt comme inhibitrice de TSC1/2.

L'activation de ces 2 voies régulatrices de mTOR a été étudiée : les formes phosphorylées de AMPK α , AMPK β , Akt et TSC2 ont été analysées par western-blot sur des extraits protéiques totaux de cellules PC-3 soumises à la PpIX-dSd photoactivée ou non aux temps 24 et 48h. A noter qu'une diminution d'expression de la forme phosphorylée (Ser473) de Akt a précédemment été décrite en cas de photoactivation de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm, c'est ici l'expression de cette forme phosphorylée mais également d'une autre forme phosphorylée (Thr 308) qui a été étudiée (**Figure R-46**).



La photoactivation de la PpIX-dSd induit une diminution de l'activation de la voie AMPK. En effet, dans ces conditions, le niveau d'expression de AMPK α , AMPK β et de leurs formes phosphorylées est diminué aux temps 24 et 48h. Il en est de même pour la voie Akt qui voit l'expression de ses formes phosphorylées (Ser473 ou Thr308) diminuer également dans ces conditions. Concernant le complexe TSC1/2, l'expression de TSC2 et de l'ensemble de ses formes phosphorylées (Ser939, Ser1387, Thr1462) est diminuée 24 et 48h après la photoactivation de la PpIX-dSd (**Figure R-46**).

Le complexe TSC1/2 étant connu comme un régulateur négatif de mTOR, son inhibition peut être mise en corrélation avec l'activation de mTOR précédemment observée. Enfin, sachant que la voie AMPK et la voie Akt jouent respectivement le rôle de régulateur positif et négatif de TSC1/2, la mise en évidence de leur inhibition tend à penser que la voie AMPK serait régulatrice de TSC1/2 et donc de mTOR dans notre modèle et non la voie Akt. Ainsi, dans le modèle étudié, la voie Akt n'exerce pas son rôle de régulateur de la voie mTOR mais son inhibition corrélée au processus apoptotique fait d'elle une voie de survie cellulaire inhibée en cas de PDT.

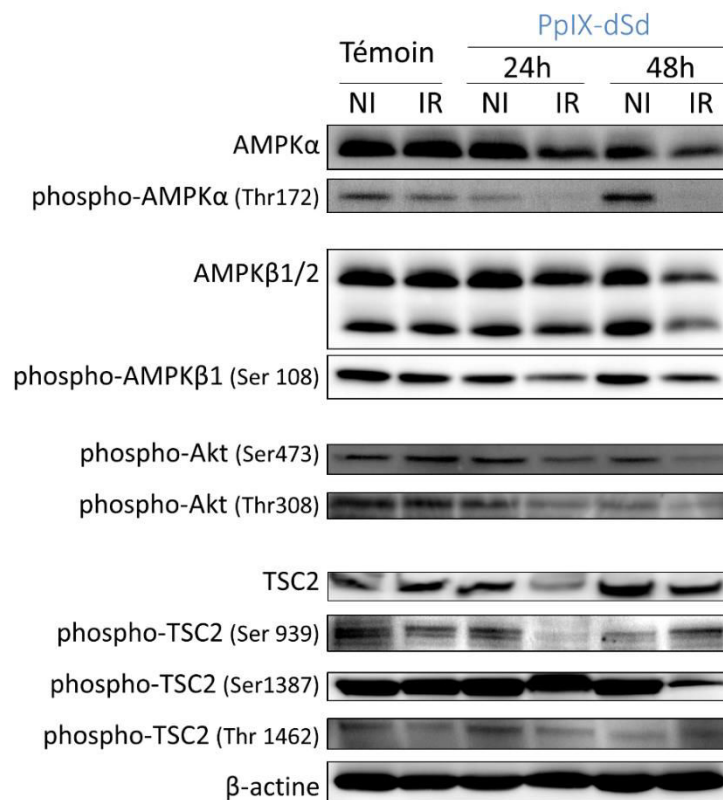


Figure R- 46 – Effets de la protoporphyrine IX dispersée sur l'activation des régulateurs de mTOR dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.

L'activation des voies AMPK et Akt est étudiée par western blot avec un anticorps dirigé contre les formes phosphorylées de AMPK α , AMPK β et Akt en position Ser473 et Thr308. De plus, l'activation de TSC2 est également étudiée grâce au niveau d'expression de ses formes phosphorylées (Ser939, Ser1387 et Thr1462). La photoactivation des PS induit une inhibition des voies AMPK et Akt ainsi qu'une inhibition de TSC2.

L'ensemble de ces résultats quant à l'activation de la voie mTOR permet de corréler l'activation de la voie AMPK/TSC1/mTOR, connue comme inhibitrice de l'autophagie, à l'inhibition de l'expression des marqueurs autophagiques.



Néanmoins, la conversion de LC3-I en LC3-II retrouvée en cas de photoactivation de la PpIX-dSd reste un point à élucider. Afin de conclure quant à un phénomène éventuel lignée dépendant, le niveau d'expression de différents marqueurs autophagiques ont été étudiés dans les lignées DU 145 et LNCaP dans les mêmes conditions.

I.7.3. Variation d'expression des acteurs autophagiques dans les lignées cellulaires DU 145 et LNCaP

Les cellules DU 145 et LNCaP ont étéensemencées à la densité déterminée, traitées 24h avec la protoporphyrine IX dispermidinée photoactivée ou non. Dans ces conditions, les niveaux d'expression de Bécline-1, certaines protéines ATG et la conversion de LC3-I en LC3-II sont étudiés par western-blot sur des extraits protéiques totaux de cellules récupérées 24 et 48h après la photoactivation du PS.

Concernant la lignée cellulaire DU 145, les résultats obtenus sont similaires à ceux obtenus pour la lignée cellulaire PC-3. En effet, la photoactivation de la PpIX-dSd induit une activation de mTOR démontrée par l'augmentation de l'expression de sa forme phosphorylée aux temps 24 et 48h, une diminution de l'expression des acteurs précoces et tardifs de l'autophagie tels que Bécline-1, ATG5, ATG16L, ATG7 et ATG3 ainsi qu'une conversion de LC3-I en LC3-II (**Figure R-47**).

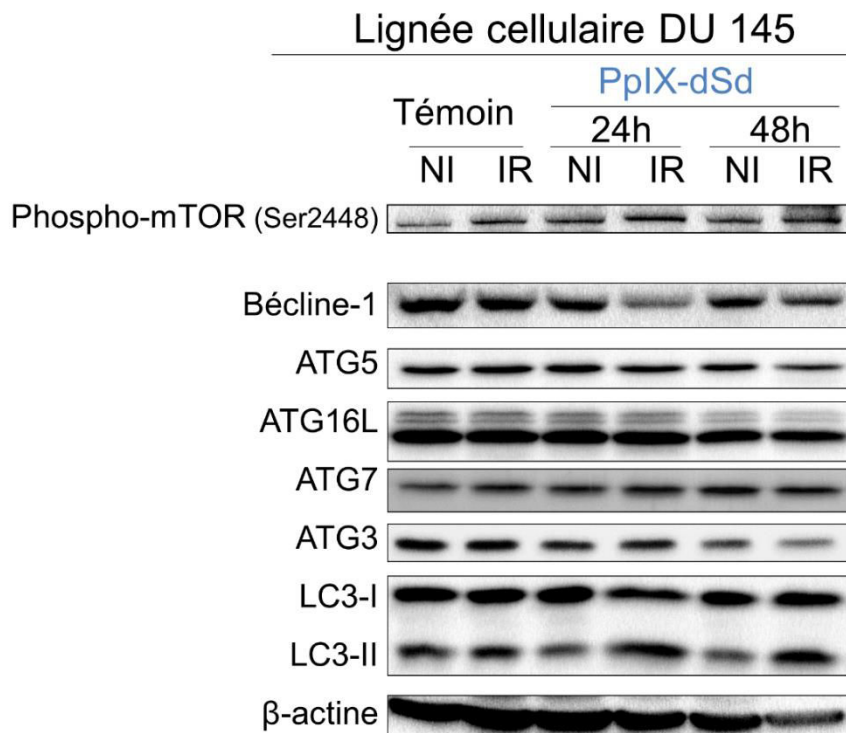


Figure R- 47 – Effets de la protoporphyrine IX dispermidinée sur l'activation de mTOR et l'expression des acteurs autophagiques dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145. L'activation de la voie mTOR est étudiée par western blot avec un anticorps dirigé contre la forme de mTOR phosphorylée en sérine 2448. L'expression des protéines impliquées dans l'initiation de l'autophagie (Bécline-1), l'élongation de l'autophagosome (ATG5, AGT12 et ATG16L) et la fusion avec le lysosome (ATG3, LC3-I et LC3-II) est étudiée par western-blot. La photoactivation des PS induit une augmentation de l'activation de mTOR, connu comme inhibiteur de l'autophagie, une diminution de l'expression de l'ensemble des acteurs autophagiques mais induit néanmoins la conversion de LC3-I en LC3-II.



Concernant la lignée cellulaire LNCaP, la photoactivation de la PpIX-dSd induit une diminution de l'activité de mTOR démontrée par la diminution de l'expression de sa forme phosphorylée aux temps 24 et 48h. Cette photoactivation a peu d'effet sur l'expression des protéines agissant aux phases précoce et tardive de l'autophagie telles que Bécline-1, ATG7 et ATG3. Enfin, dans ces mêmes conditions, les niveaux d'expression de LC-3 montrent qu'une conversion de LC3-I en LC3-II est induite (**Figure R-48**).

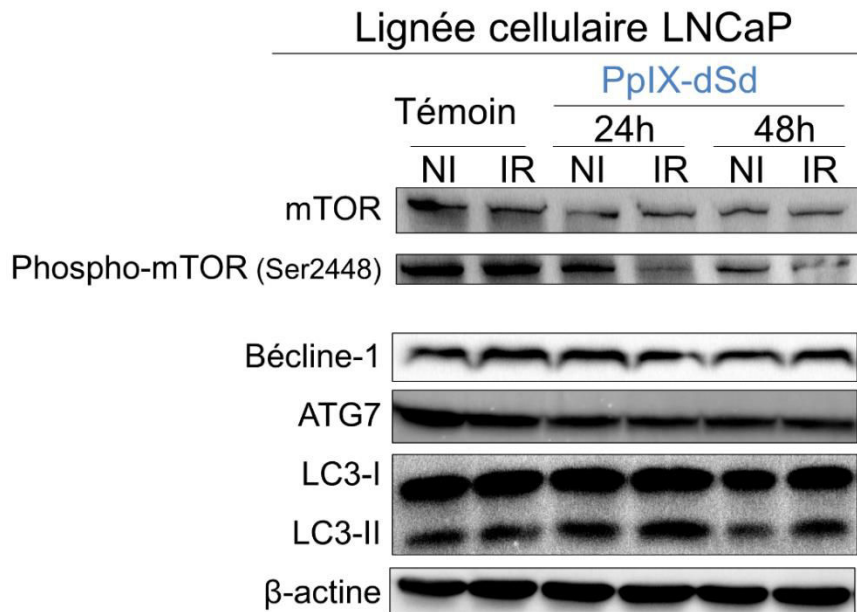


Figure R- 48 – Effets de la protoporphyrine IX dispermidinée sur l'activation de mTOR et l'expression des acteurs autophagiques dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP.

L'activation de la voie mTOR est étudiée par western blot avec un anticorps dirigé contre la forme de mTOR phosphorylée en sérine 2448. L'expression des protéines impliquées dans l'initiation de l'autophagie (Bécline-1), et la fusion avec le lysosome (ATG7, LC3-I et LC3-II) est étudiée par western-blot. La photoactivation des PS induit une diminution de l'activation de mTOR, connu comme inhibiteur de l'autophagie, a peu d'effet sur l'expression de des acteurs autophagiques mais induit néanmoins la conversion de LC3-I en LC3-II.

Dans les trois lignées cellulaires cancéreuses prostatiques humaines étudiées, la photoactivation de la PpIX-dSd induit l'inhibition de la voie autophagique mais permet néanmoins la conversion de LC3-I en LC3-II. L'un des régulateurs directs de LC3 est le facteur p53 considéré comme inhibiteur de la conversion de LC3-I en LC3-II. Ainsi, une hypothèse soumise serait que la diminution de l'activation de p53 observée précédemment puisse être corrélée à la conversion de LC3-I en LC3-II observée. La levée de l'inhibition de p53 sur LC3 permettrait sa conversion malgré la diminution d'expression des acteurs autophagiques agissant plus précocement dans le processus. Cette voie reste encore à étudier.

Néanmoins, plusieurs études ont démontré que l'activation seule de LC3 ne permettait pas une autophagie efficace. En effet, l'inhibition des facteurs agissant plus précocement dans l'autophagie serait à l'origine d'une incapacité des autophagosomes à fusionner avec le lysosome, rendant ainsi le processus autophagique partiel et incapable d'induire une quelconque résistance à l'apoptose.

Pour conclure, la photoactivation de la PpIX-dSd induit une activation de la voie AMPK/mTOR à l'origine de l'inhibition de l'expression des acteurs de l'autophagie précoce rendant ainsi le processus autophagique partiel et inefficace, malgré la conversion de LC3-I en LC3-II.



I.7.4. Diminution de l'expression de la protéine Bcl-2

La protéine Bcl-2 est un régulateur commun à l'autophagie et l'apoptose. Elle présente des caractéristiques anti-apoptotiques et inhibitrices de l'autophagie par liaison à Bécline-1. Son expression a été étudiée par western-blot sur des extraits protéiques totaux de cellules PC-3 traitées par la PpIX-dSd et la PpIX-dSm photoactivées ou non par la lumière rouge (**Figure R-49**).

Dans les cellules PC-3, la lumière seule et les PS seuls n'ont pas d'effet sur l'expression de Bcl-2. En revanche, la photoactivation des PS induit une diminution de son expression.

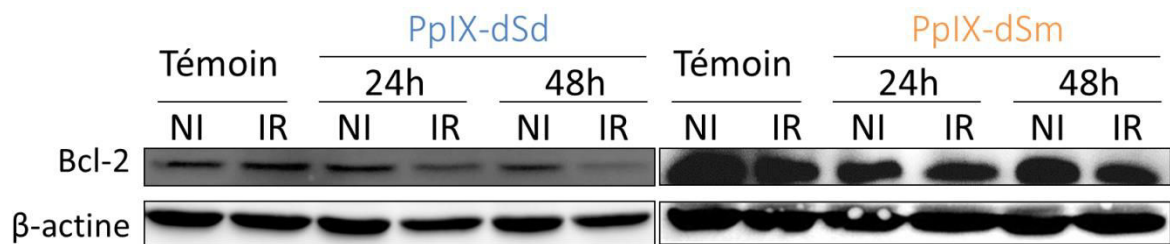


Figure R- 49 – Effets de la protoporphyrine IX polyaminée sur l'expression de Bcl-2
L'expression de la protéine Bcl-2 est étudiée par western blot. La photoactivation des PS induit diminution de l'expression de Bcl-2, connue comme protéine anti-apoptotique et comme inhibiteur de l'autophagie.

Cette diminution d'expression de Bcl-2 peut être corrélée à l'induction de l'apoptose induite par la photoactivation des PS mais son rôle dans le processus autophagique n'est pas démontré.



Chapitre II. Expérimentations *in vivo*

Les expérimentations *in vivo* de cette étude reposent sur les xéno greffes de cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3 à des souris immunodéprimées âgées de 5 semaines.

L'anesthésie des souris BALB/c est effectuée avec un mélange de Kétamine (16 mg/mL) et de Rompun (0,8 mg/mL) dilué dans du sérum physiologique et injecté dans le péritoine des souris. La kétamine est un analgésique non barbiturique. Son utilisation seule produit chez les rongeurs une rigidité musculaire et parfois une durée d'anesthésie insuffisante. C'est pourquoi la Kétamine est associée à la xylazine (ou Rompun) pour induire une bonne sédation avec une induction rapide d'une durée de 90 à 120 min.

Suite à l'anesthésie des souris, le mélange suspension cellulaire/matrigel (1 :1) est injecté en position sous-cutanée de chaque côté de la région dorsale des souris. Ainsi, chaque souris porte deux tumeurs composées chacune de $5 \cdot 10^6$ cellules PC-3.

Une fois que les tumeurs ont atteint un volume de l'ordre de 120 mm^3 , les souris sont de nouveau anesthésiées et pesées afin d'être divisées en 4 groupes : témoins, PpIX, PpIX-dSd et PpIX-dSm. Les souris reçoivent une injection de 10 mg/kg de PS au niveau de la veine de la queue. Après 24h, une seule des deux tumeurs de chaque souris est soumise à deux séquences de 5 min d'irradiation par la lumière rouge (630 nm, 100 mW). Les souris témoins reçoivent uniquement l'irradiation sans administration d'un autre produit.

Les différentes conditions établies vont permettre de :

- Discriminer les effets de la lumière seule grâce aux tumeurs irradiées portées par les souris témoins.
- Discriminer les effets des PS seuls grâce aux tumeurs non irradiées portées par les souris traitées par la PpIX, la PpIX-dSd ou la PpIX-dSm.
- Evaluer les effets des PS photoactivés grâce aux tumeurs irradiées portées par les souris traitées par la PpIX, la PpIX-dSd ou la PpIX-dSm.

Pour cette étude, les volumes tumoraux sont mesurés du jour 0 (jour de l'irradiation) au jour 21 à l'aide d'un pied à coulisse afin d'étudier la croissance des tumeurs selon les conditions. Au jour 21, les souris sont sacrifiées et les tumeurs récupérées en vue d'effectuer différentes analyses histologiques : une coloration hématoxyline-éosine-safran (HES) permettra d'étudier les structures et morphologie des cellules constituant les tumeurs, un marquage au Ki-67 permettra d'étudier la prolifération cellulaire alors qu'une immunohistochimie de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 permettra d'évaluer le niveau de celle-ci et donc l'induction ou non du processus apoptotique au sein des différentes tumeurs.



II.1. Etude des variations du volume tumoral

Du jour 0, jour de l'irradiation, au jour 21, les volumes tumoraux de l'ensemble des souris sont mesurés à l'aide d'un pied à coulisse afin d'étudier les effets de la lumière seule, des 3 PS seuls et des 3 PS photoactivés par la lumière rouge sur la croissance tumorale (**Figure R-50**).

Suite à ces mesures, il apparaît qu'au cours du temps (de J0 à J21), l'ensemble des tumeurs portées par les souris témoins (non traitées par un PS) présente un volume tumoral équivalent qu'elles soient soumises à l'irradiation ou non. La lumière seule n'induit donc pas de changement du volume tumoral.

Chez les souris traitées par la PpIX, les tumeurs, qu'elles soient soumises à l'action de la lumière rouge ou non présentent des volumes tumoraux comparables aux tumeurs des souris témoins durant les 21 jours d'intérêt. Il semble donc que la PpIX, activée ou non par la lumière rouge, n'a pas d'effet sur le volume tumoral. A cette concentration (10 mg/kg), la PpIX photoactivée ne semble pas montrer d'efficacité contre la croissance tumorale.

Chez les souris traitées par la PpIX-dSd, les tumeurs n'ayant pas subi d'irradiation ont un volume tumoral équivalent aux tumeurs des souris témoins alors que le volume de celles soumises à l'irradiation rouge apparaît inférieur à celui des tumeurs des souris témoins à partir du jour 10 (185 mm³ contre 351 mm³) et cela jusqu'au jour 21 (359 mm³ contre 682 mm³). Ainsi, utilisée à 10 mg/kg, la PpIX-dSd induit un ralentissement de la croissance tumorale uniquement en cas de photoactivation par la lumière rouge.

Enfin, chez les souris traitées par la PpIX-dSm, l'ensemble des tumeurs (irradiées ou non) présente un volume comparable aux tumeurs des souris témoins du jour 0 au jour 21. Ainsi, utilisée à 10 mg/kg, la PpIX-dSm ne présente aucune efficacité contre la croissance tumorale, qu'elle soit activée ou non par la lumière rouge.

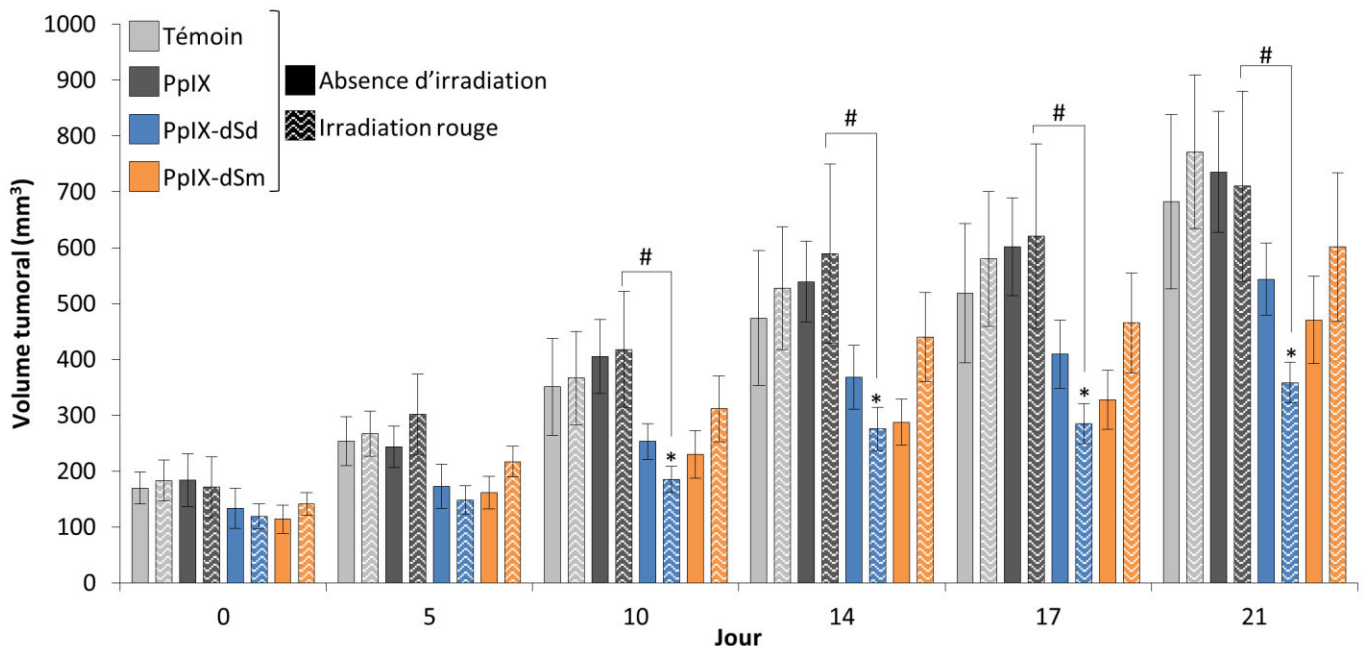


Figure R- 50 – Effets des photosensibilisateurs sur la croissance tumorale de cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3 xénotransplantées sur des souris nues.

Le volume des tumeurs est mesuré à l'aide d'un pied à coulisse du jour 0 (jour de l'irradiation) au jour 21. Seule la PpIX-dSd photoactivée par la lumière rouge induit un ralentissement de la croissance tumorale.



En comparaison aux tumeurs témoins qui présentent un volume de 682 mm³, les tumeurs soumises uniquement à l'irradiation présentent un volume équivalent (772 mm³). Les tumeurs soumises à l'action de la PpIX, ou de la PpIX-dSd ou de la PpIX-dSm non photoactivées, présentent respectivement des volumes de l'ordre de 736 mm³, 544 mm³ et 471 mm³, ce qui ne représente pas une différence significative en comparaison aux tumeurs témoins. Enfin, la photoactivation de la PpIX et de la PpIX-dSm aboutit à la même croissance des tumeurs puisque dans ces conditions les volumes tumoraux sont respectivement de l'ordre de 710 mm³ et 601 mm³. En revanche, la PpIX-dSd permet de diminuer le volume tumoral puisqu'il est de l'ordre de 359 mm³ au jour 21, ce qui est une différence significative en comparaison aux tumeurs témoins.

Après prélèvement des tumeurs, cette différence de masse tumorale est parfaitement visible. La masse tumorale des tumeurs traitées par la PpIX-dSd photoactivée par la lumière rouge est bien inférieure à celle des autres conditions avec un volume tumoral 2 fois moins important (**Figure R-51**).

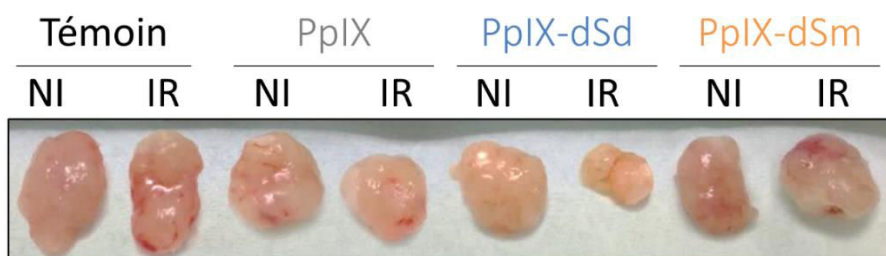


Figure R- 51 – Effets des photosensibilisateurs sur la croissance tumorale de cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3 xénotreffées sur des souris nues.

Les tumeurs sont récupérées au jour 21 et photographiées. Les PS seuls (NI) n'ont pas d'effet sur le volume tumoral. En revanche, seule la PpIX-dSd photoactivée par la lumière rouge (IR) induit un ralentissement de la croissance tumorale.

Ces premiers résultats permettent à la fois de discriminer le rôle de la lumière seule et des PS seuls dans un éventuel ralentissement de la croissance tumorale. En revanche, à 10 mg/kg, la PpIX-dSd semble le seul PS efficace pour lutter contre la croissance tumorale lorsqu'elle est photoactivée par la lumière rouge. Ainsi, à une même concentration, la PpIX-dSd apparaît donc plus efficace que la PpIX et la PpIX-dSm.

Afin d'étudier les causes de l'induction ou non de ce ralentissement tumoral, la structure des cellules composant les tumeurs, la prolifération cellulaire et le niveau d'expression de protéines impliquées dans le processus apoptotique sont étudiés au sein des tumeurs. Pour cela, des coupes histologiques de celles-ci sont effectuées à l'aide d'un cryostat suite à une inclusion en paraffine.



II.2. Absence d'effet des PS sur la structure des tumeurs

Afin d'avoir une vue d'ensemble de la morphologie et de la structure des tumeurs récupérées, une coloration hématoxyline-éosine-safran (HES) est effectuée sur des coupes histologiques de ces tumeurs. La coloration hématoxyline éosine safran (HES) est une coloration trichromatique dite topographique. Elle permet une vue d'ensemble de la morphologie et de la structure cellulaire d'un tissu. L'hématoxyline est un colorant cationique qui a une affinité pour les éléments cellulaires chargés négativement. Il colore notamment les noyaux en bleu/violet, en se fixant sur les acides nucléiques. A contrario, l'éosine est un colorant anionique ayant une affinité pour les éléments cellulaires chargés positivement. Il colore le cytoplasme en rose et les autres éléments cellulaires basiques en rose/rouge plus ou moins vifs selon leur acidophilie. Le safran, quant à lui, colore en jaune les fibres de collagène des tissus conjonctifs. Plus précisément, il colore de manière directe et régressive (coloration excessive suivie d'une étape de différenciation). Etant une grosse molécule, il pénètre très peu dans les autres structures plus denses.

Après coloration, les coupes tumorales peuvent être mises entre lame et lamelle pour une observation au microscope optique (grossissement x100). L'analyse des coupes tumorales ainsi soumises à la coloration HES ne permet pas de conclure quant aux effets de la lumière seule, des PS seuls et des PS photoactivés par la lumière rouge sur la structure des cellules constituant cette tumeur au 21^{ème} jour. En effet, pour l'ensemble des conditions précédemment citées, aucune différence significative des structures cellulaires et de leur morphologie n'est observée. Les cellules sont nombreuses, disposées de façon anarchique, leurs cytoplasmes paraissent denses et leurs noyaux nombreux. Seule, la coupe correspondant à la tumeur irradiée provenant d'une souris traitée par la PpIX-dSd semble présenter des cellules dont le cytoplasme apparaît moins dense que pour les autres conditions (**Figure R-52**).

L'observation microscopique de ces coupes permet également de mettre en évidence une vascularisation assez importante des tumeurs du fait de la visualisation de plusieurs vaisseaux sanguins circulant au sein de la tumeur.

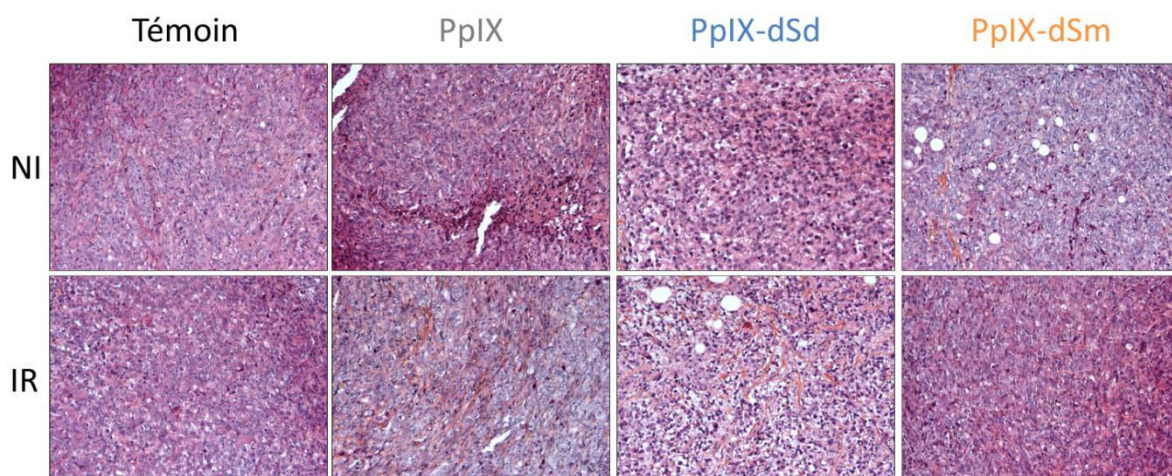


Figure R- 52 – Effets des photosensibilisateurs sur la structure des cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3 xénotreffées sur des souris nues.

Une coloration hématoxyline-éosine-safran (HES) est effectuée sur des coupes de tumeurs récupérées au jour 21. La photoactivation des PS n'induit aucune différence de structure des cellules composant les tumeurs.



II.3. Diminution de la prolifération des tumeurs

Le Ki-67 est un marqueur important de la prolifération cellulaire. Le terme de Ki-67 est une abréviation de la ville de Kiel en Allemagne où a eu lieu la découverte de cette protéine présente dans le noyau des cellules pendant la division cellulaire. L'expression de Ki-67 augmente tout au long du cycle cellulaire pour atteindre un pic en phase S. Il est néanmoins absent en phase G₀. Suite à un marquage au Ki-67, les noyaux sont facilement visibles grâce à leur couleur rouge foncé.

Après marquage au Ki-67, les coupes tumorales peuvent être mises entre lame et lamelle pour une observation au microscope optique (grossissement x100). L'analyse des coupes tumorales ainsi soumises au marquage permet de conclure quant aux effets de la lumière seule, des PS seuls et des PS photoactivés par la lumière rouge sur la prolifération des cellules composant cette tumeur au 21^{ème} jour.

En effet, les tumeurs soumises à l'action de la lumière seule ne présentent pas de différence significative de marquage au Ki-67 en comparaison aux tumeurs témoins (non traitées et non irradiées). Il en est de même pour les tumeurs soumises à l'action des PS seuls ; la majorité des cellules sont marquées au Ki-67 et sont donc en prolifération.

A l'inverse, les tumeurs irradiées provenant de souris traitées par la PpIX-dSd présentent une majorité de cellules dont les noyaux ne sont pas marqués par le Ki-67. La photoactivation de la PpIX-dSd induit une diminution de la proportion de cellules marquées au Ki-67, ce qui est représentatif d'une diminution de la prolifération cellulaire.

En revanche, sous l'action des autres PS (PpIX ou PpIX-dSm) photoactivés par la lumière rouge, les tumeurs présentent une proportion de cellules marquées au Ki-67 similaire aux tumeurs témoins. Ainsi, la photoactivation de ce PS ne semble pas induire de diminution de la prolifération dans les tumeurs xéno greffées chez ces souris nudes (**Figure R-53**).

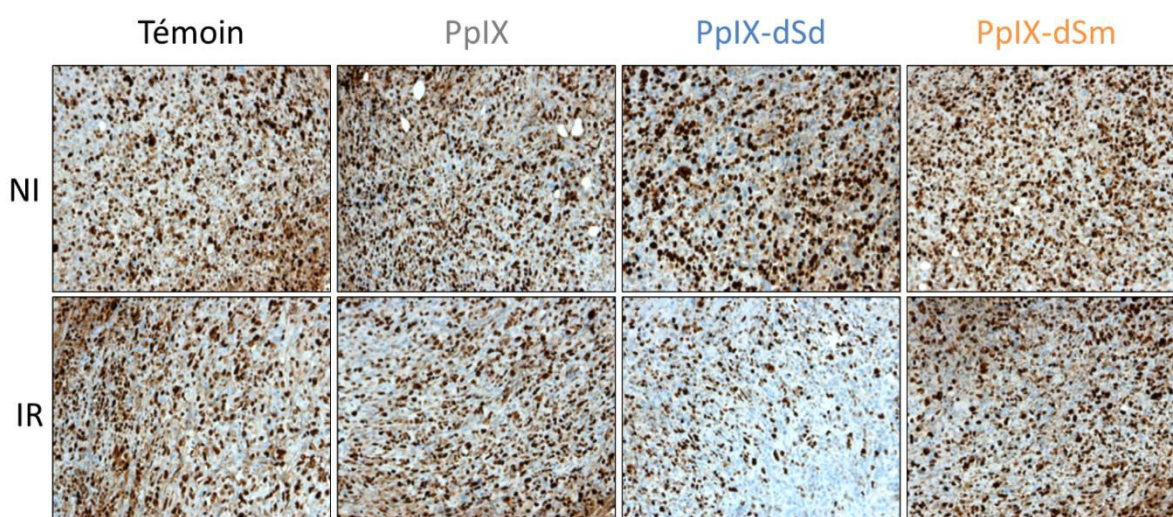


Figure R- 53 – Effets des photosensibilisateurs sur la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3 xéno greffées sur des souris nudes.

Un marquage au Ki-67 est effectué sur des coupes de tumeurs récupérées au jour 21. Les PS seuls (NI) n'ont pas d'effet sur la prolifération cellulaire. Mais la photoactivation de la PpIX-dSd induit une diminution du marquage au Ki-67 donc une diminution de la prolifération des cellules composant les tumeurs.



Ces résultats peuvent être mis en corrélation avec les résultats obtenus quant à la mesure des volumes tumoraux. En effet, seule la PpIX-dSd photoactivée induit un ralentissement de la croissance tumorale, ralentissement pouvant être mis en lien avec la diminution de la prolifération cellulaire observée dans cette même condition. La présence d'une faible proportion de cellules marquées par le Ki-67 révèle la présence de cellules encore en prolifération malgré la photoactivation de la PpIX-dSd. Ces cellules pourraient donc être responsables du fait que seul un ralentissement, et non une inhibition totale, de la croissance tumorale soit observé.

II.4. Diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 au sein des tumeurs

Suite à cette technique d'immunohistochimie, les coupes tumorales peuvent être mises entre lame et lamelle pour une observation au microscope optique (grossissement x100). L'analyse des coupes tumorales permet de conclure quant au niveau d'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans les tumeurs soumises à l'action de la lumière seule, des PS seuls et des PS photoactivés par la lumière rouge au 21^{ème} jour. A l'exception des tumeurs traitées par la PpIX-dSd photoactivée par la lumière rouge, l'ensemble des tumeurs présentent un marquage soit un niveau d'expression similaire de Bcl-2. En effet, c'est uniquement en cas de photoactivation de la PpIX-dSd que le niveau d'expression de Bcl-2 se trouve diminué. Bcl-2 exerçant un effet anti-apoptotique, son inhibition peut sous-entendre l'initiation du processus apoptotique dans cette condition (**Figure R-54**).

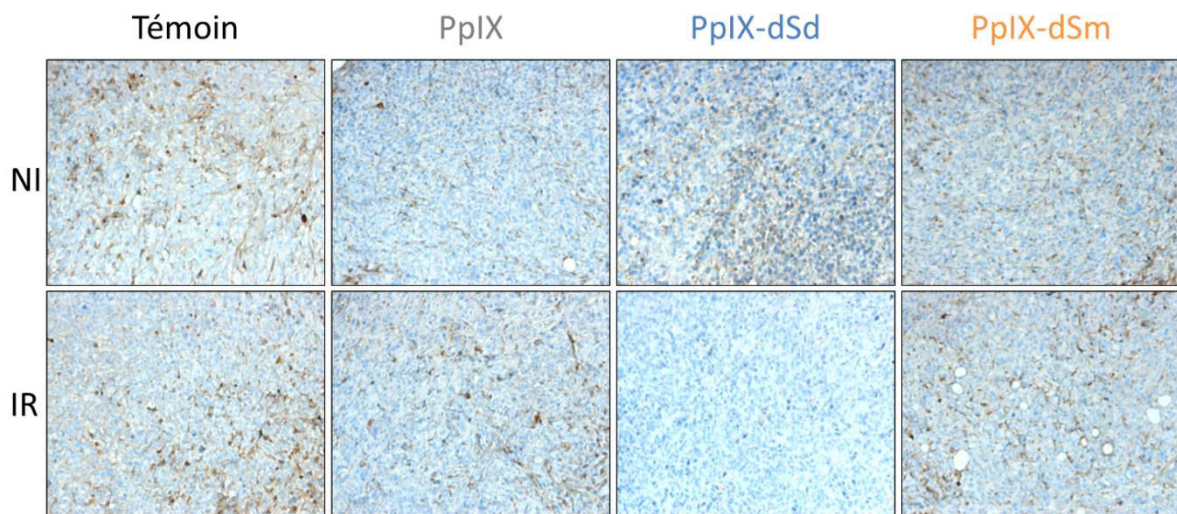


Figure R- 54 – Effets des photosensibilisateurs sur l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3 xénotreffées sur des souris nues. Une immunohistochimie utilisant un anticorps dirigé contre la protéine Bcl-2 est effectuée sur des coupes de tumeurs récupérées au jour 21. Les PS seuls (NI) n'ont pas d'effet sur l'expression de Bcl-2 mais la photoactivation de la PpIX-dSd induit une diminution de l'expression de cette protéine anti-apoptotique.

L'ensemble de ces résultats obtenus sur ces coupes histologiques de tumeurs permet d'affirmer que seule la PpIX-dSd photoactivée par la lumière rouge induit un ralentissement de la croissance tumorale corrélé à une diminution de la proportion de cellules en prolifération, les autres cellules ayant subi le processus de mort cellulaire programmée ou apoptose.



DISCUSSION



Le cancer de la prostate fait partie des cancers les plus fréquents dans le monde. La variété des traitements actuellement utilisés présente des résultats intéressants mais les cas de récurrences et de résistance restent tout de même nombreux.

Dans l'optique de développement de thérapie focale et dans le cadre de la PDT, la recherche tend à développer des PS capables à la fois de cibler spécifiquement les cellules tumorales et d'inhiber leur prolifération. Dans ce but, l'analyse de leur capacité à induire un blocage du cycle cellulaire et/ou à induire le processus de mort cellulaire programmée ou apoptose au sein de ces cellules a été effectuée. De nombreuses molécules naturelles ou synthétiques ont démontré leur pouvoir pro-apoptotique. Néanmoins, nombreuses d'entre elles sont également inductrices d'un phénomène de résistance à l'apoptose, rendant ainsi nécessaire le couplage de ce traitement à des inhibiteurs de ces voies de résistance.

C'est dans ce contexte que le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de Limoges a développé une nouvelle stratégie de ciblage des cellules tumorales par les PS : le couplage d'un photosensibilisateur connu, la protoporphyrine IX, à des polyamines telles que la spermidine ou la spermine. Deux nouveaux PS ont ainsi pu être synthétisés : la protoporphyrine IX dispermidinée (PpIX-dSd) et la protoporphyrine IX disperminée (PpIX-dSm).

Dans un premier temps, cette étude a permis d'étudier l'intérêt de la vectorisation de la PpIX par des polyamines quant au ciblage des cellules tumorales. Dans un second temps, les effets biologiques de la photoactivation de ces nouveaux PS par la lumière rouge ont été étudiés au sein de plusieurs lignées cancéreuses prostatiques humaines, et notamment leur capacité à induire un blocage du cycle cellulaire et à induire le processus apoptotique. De plus, afin de déceler une éventuelle induction d'une résistance à ce traitement, l'activation des voies les plus fréquemment impliquées dans ce phénomène a été vérifiée. Enfin, les résultats obtenus *in vitro* ont été validés *in vivo* à partir de xénogreffes de cellules cancéreuses prostatiques humaines à des souris nues.



Chapitre I. Etude *in vitro* des effets de nouveaux photosensibilisateurs pour le traitement du cancer de la prostate par photothérapie dynamique

I.1. Intérêt de la vectorisation de la PpIX par des polyamines

Du fait de leur implication dans la prolifération cellulaire, les polyamines représentent une source énergétique essentielle pour les cellules cancéreuses. Ce besoin accru en polyamines des cellules tumorales représente, pour la recherche, un moyen de les discriminer des cellules saines. Face à la nécessité de développer des agents anti-cancéreux capables de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses, les polyamines apparaissent comme un outil intéressant de vectorisation de ces drogues. Une telle approche, justement comparée au cheval de Troie, fait du système de transport des polyamines (PTS) une porte d'entrée pour ces drogues vers les cellules présentant une forte activité de ces transporteurs telles que les cellules tumorales. Cette stratégie permettrait donc de limiter l'effet toxique des drogues aux cellules cancéreuses, en préservant ainsi les cellules saines environnantes.

Cette stratégie de vectorisation déjà mise au point pour certains agents anticancéreux tels que le chlorambucil (76), l'aminoacridine (77) ou les anthracènes (78), représente une innovation thérapeutique dans le contexte de la PDT puisque celle-ci n'a jamais été développée concernant le ciblage de PS.

Le rôle de ce système de transport des polyamines (PTS) quant à l'efficacité des PS vectorisés par les polyamines a pu être mis en évidence grâce aux tests de viabilité effectués dans les lignées ovariennes de hamster CHO et CHO-MG, la lignée CHO-MG étant la lignée CHO présentant une mutation inactivatrice du PTS. Toute diminution de toxicité des PS entre CHO et CHO-MG serait la preuve que la PpIX vectorisée utilise le PTS comme porte d'entrée vers la cellule. Les PS d'intérêt, la PpIX-dSd et la PpIX-dSm, présentent une meilleure efficacité dans les cellules CHO en comparaison aux cellules CHO-MG. Il semblerait donc que l'activité du PTS au sein des cellules CHO permette un meilleur ciblage des cellules par les PS et donc une meilleure efficacité. Néanmoins, une inhibition de la prolifération des cellules CHO-MG est induite par les PS photoactivés malgré la déficience de ces cellules pour ces transporteurs. Il semblerait que les expérimentations *in vitro* influencent l'accumulation des PS au sein des cellules. En effet, en flasques de culture, aucune élimination des PS n'est possible, laissant ainsi les cellules CHO-MG au contact des PS durant 24h, durée permettant certainement aux PS d'entrer dans la cellule par d'autres moyens que le PTS. Une diffusion simple des PS au travers de la membrane plasmique des cellules CHO-MG expliquerait l'inhibition de leur prolifération retrouvée en cas de photoactivation des PS, malgré une déficience des cellules pour le PTS.

Ces mêmes tests de viabilité effectués sur trois lignées cancéreuses prostatiques humaines (PC-3, DU 145 et LNCaP) et sur une lignée prostatique saine (RWPE-1) ont également permis de mettre en évidence l'intérêt de cette vectorisation dans ce modèle pathologique qu'est le cancer de la prostate. Au sein de chaque lignée étudiée, la vectorisation de la PpIX avec des polyamines permet d'augmenter l'efficacité de celle-ci. En effet, en comparaison à la PpIX non vectorisée, la PpIX-dSd et la PpIX-dSm permettent une inhibition plus importante de la prolifération cellulaire. De plus, ces PS nouvellement synthétisés présentent une toxicité plus importante dans les cellules cancéreuses en comparaison aux cellules saines. Ainsi, utilisés à une dose toxique pour les cellules cancéreuses, ces PS ne présentent aucune phototoxicité dans les cellules saines, donnée fondamentalement importante quant à la préservation des tissus sains lors d'un traitement par PDT. Enfin, dans



les cellules cancéreuses prostatiques PC-3, DU 145 et LNCaP, ces nouveaux PS se sont avérés être plus efficaces que le Photofrin® et le 5-ALA, des PS couramment utilisés dans le cadre de la PDT. Cette meilleure efficacité de ces dérivés polyaminés de la PpIX face au Photofrin® avait déjà été mise en évidence dans les lignées cellulaires HaCat et MCF-7 (197).

Ces tests de viabilité ont également permis de mettre en évidence l'absence de toxicité des PS en absence de lumière lorsqu'une gamme de concentration de l'ordre de 10 à 200 ng/ml est utilisée. A l'inverse, une précédente étude a démontré que ces PS pouvaient présenter une toxicité vis-à-vis des cellules leucémiques K562 même à l'obscurité (198).

Les polyamines étant impliquées dans la prolifération cellulaire, il était probable que la présence des PS polyaminés au sein de cellules non irradiées favorise leur prolifération. Il s'est avéré que ce n'était pas le cas. Ainsi, dans le cadre d'un traitement de patients par PDT, l'hypothèse selon laquelle les PS puissent atteindre des métastases cancéreuses non localisées et non irradiées et puissent favoriser leur croissance est écartée.

La capacité des polyamines à favoriser l'accumulation de la PpIX dans les cellules cancéreuses a été mise en évidence grâce à la microscopie confocale et la fluorescence naturelle dans le rouge de la PpIX. En effet, cette fluorescence a permis de quantifier la présence de la PpIX vectorisée ou non au sein des cellules tumorales. Utilisée à une même concentration, une plus importante fluorescence intracellulaire de la PpIX est retrouvée en cas de vectorisation par les polyamines. Ces dernières sont donc essentielles à la capture du PS.

Enfin, le spectre d'absorption du PS sélectionné présentant un pic d'absorption maximal dans le bleu (410 nm), la PpIX apparaîtrait davantage comme un PS utilisable dans le traitement de tumeurs superficielles. Néanmoins, la présence d'un plus petit pic dans le rouge (635 nm) laisse l'espoir d'une utilisation dans des tumeurs plus profondes (199). La vectorisation de la PpIX à l'aide de polyamines n'ayant pas induit de modifications de son spectre d'absorption, c'est dans ce contexte que la photoactivation des nouveaux PS a été effectuée : premièrement grâce à la lumière blanche pour exciter l'ensemble du spectre de la PpIX puis grâce à la lumière rouge dans cette hypothèse d'un traitement de tumeurs plus profondes telles que les tumeurs prostatiques. Il apparaît que la PpIX soit davantage efficace lorsque l'ensemble de ses pics d'absorption sont sollicités c'est-à-dire lorsque la photoactivation est faite par la lumière blanche. Néanmoins, la PpIX polyaminée présente une efficacité très intéressante (IC_{50} de l'ordre du ng/mL) lorsqu'elle n'est soumise qu'à un rayonnement dans le rouge.

L'ensemble de ces premiers résultats permet d'affirmer que la PpIX-dSd et la PpIX-dSm répondent aux critères clés d'un photosensibilisateur : une composition constante, une toxicité nulle à l'obscurité, une amélioration de la sélectivité tumorale permise grâce aux polyamines, une absorption dans le rouge indispensable au traitement de tumeurs profondes.

A l'instar des agents anticancéreux développés ces dernières années, la PpIX-dSd et la PpIX-dSm photoactivées par la lumière rouge induisent une inhibition de la prolifération cellulaire. La suite de cette étude s'est intéressée à étudier les mécanismes à l'origine de cette inhibition de la prolifération cellulaire : un blocage du cycle cellulaire et/ou l'induction du processus apoptotique.



I.2. Induction d'un blocage du cycle cellulaire

Dans le cadre de la PDT, l'effet des PS sur le cycle cellulaire est très peu étudié, laissant la préférence pour l'étude de l'induction du processus apoptotique. Néanmoins, il a été démontré que la 5-5-(4-N,N-diacétoxyphenyl)-10,15,20-tétraphénylporphyrine (DTPP) induisait un blocage en phase S des cellules d'adénocarcinome pulmonaire (LA795) (200). Les effets du 5-ALA, un précurseur de la PpIX, ont également été étudiés au sein de diverses lignées cancéreuses : il induit un arrêt en phase G₀/G₁ des cellules de cancer de l'œsophage (100) et des cellules de cancer du col de l'utérus (201). Ses effets sur l'un des modèles cellulaires de cette étude, la lignée cancéreuse prostatique humaine PC-3, restent discutés.

En effet, dans leur étude, Bhowmick et al. ont démontré que le 5-ALA (1 mM, irradiation 0,7 J/cm²) induit une augmentation du taux de cellules en phase S (202). A l'inverse, Postiglione et son équipe affirment que le 5-ALA (0,5-1 mM, irradiation 0-20 J/cm²) n'a aucun effet sur le cycle des cellules PC-3 et justifient en partie ce phénomène par l'absence d'expression de p53 dans les cellules PC-3 (203), même s'il s'avère que des altérations du cycle sont tout de même retrouvées dans certaines lignées cellulaires déficientes pour p53.

Au vue de ces données, notre étude s'est portée sur l'analyse des effets de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm sur le cycle cellulaire de trois lignées cancéreuses prostatiques humaines présentant différents profils d'expression de p53 (204) afin de conclure quant à l'éventuelle implication de p53 sur la répartition des cellules dans le cycle cellulaire :

- la lignée cellulaire PC-3 est mutée pour p53 : une délétion au niveau du codon 188 d'un allèle et l'apparition d'un codon 169 non-sens sur l'autre allèle font que les cellules PC-3 ne présentent pas de protéine p53 fonctionnelle.
- la lignée cellulaire DU 145 est mutée pour p53. Les cellules DU 145 sont hétérozygotes pour p53 : l'un des allèles comportant 2 mutations (P223L/V274F) au sein du domaine de liaison de p53 à l'ADN, faisant de la protéine p53 une protéine non fonctionnelle dans ces cellules.
- La lignée LNCaP présente un profil pour p53 normal et donc une protéine p53 fonctionnelle.

Dans ce modèle d'étude, et notamment dans les lignées cellulaires PC-3 et DU 145, la photoactivation des PS par la lumière rouge induit, dès 24h, une accumulation des cellules au niveau de la phase S du cycle cellulaire. En revanche, aucun effet sur la répartition des cellules dans le cycle n'est retrouvé en cas de traitement des cellules LNCaP par la PpIX-dSd et la PpIX-dSm photoactivées par la lumière rouge.

Parmi les acteurs clés du cycle cellulaire, les cyclines et les kinases dépendantes des cyclines (CDK) sont très souvent impliquées dans le blocage du cycle cellulaire. L'activation des CDK nécessite la fixation d'une cycline et est dépendante d'une phosphorylation réversible et permet le contrôle des différents passages du cycle cellulaire.

Chacune des phases du cycle cellulaire est caractérisée par l'expression d'un type particulier de cycline et les variations des taux des différentes cyclines régulent l'activité des différentes CDK (205).

L'entrée en phase G₁ est sous la dépendance de l'activation des cyclines D1, D2 et D3 qui se lient à CDK4 ou CDK6. A la fin de la phase G₁, le complexe cycline E/CDK2 induit la phosphorylation de la protéine Rb, à l'origine de la libération des facteurs de transcription E2F



et donc de l'activation de la transcription de la cycline A. Cette dernière peut alors former un complexe avec la CDK2 et induire la transition de la phase G1 à la phase S du cycle cellulaire. La cycline A indispensable à l'induction de la réplication de l'ADN se complexe à CDK1 pour permettre la transition de la phase G2 à la phase M. Le passage en M est strictement contrôlé par l'activité de CDK1 qui est elle-même étroitement régulée. En effet, sa déphosphorylation au niveau des résidus Thr 14 et Tyr 15 par la phosphatase CDC25 est nécessaire à son activation.

Dans les cellules PC-3 et DU 145, la photoactivation des PS induit une augmentation de l'expression des protéines impliquées dans la progression de la phase G1 et de la phase S, telles que la cycline E, CDK2 et la cycline A. En revanche, une inhibition de l'expression de CDK1 est également induite. CDK1 étant indispensable au passage de la phase S à la phase G2/M, l'inhibition de son expression rendant impossible la transition des cellules vers la phase de mitose pourrait être à l'origine de cette accumulation des cellules en phase S.

Parmi les régulateurs du cycle cellulaire, les inhibiteurs de CDK, les CKI, sont également impliqués dans les blocages du cycle. La protéine p21 est un CKI particulièrement impliquée dans les arrêts du cycle cellulaire en phase G0/G1 et au cours de la transition G2/M. La protéine p21 est donc l'un des principaux médiateurs de l'arrêt du cycle cellulaire et sa transcription peut être activée par p53 qui agit alors comme facteur de transcription. Ainsi, diverses perturbations augmentent les niveaux cellulaires de p53 et augmentent également son activité, principalement par sa phosphorylation sur la sérine 15 et sur la sérine 20.

Dans les cellules PC-3 (p53 -/-), la photoactivation des PS induit une diminution de l'expression de p53 et de sa forme phosphorylée ainsi qu'une diminution de l'expression de p21. Dans cette lignée, il semblerait donc que le blocage du cycle cellulaire observé ne soit pas sous la régulation de la voie p53/p21, ce qui peut être corrélé à l'absence de fonctionnalité de p53 dans ces cellules.

Dans les cellules DU 145 (p53 +/-), la photoactivation des PS n'induit pas de variation d'expression de p53 et de sa forme phosphorylée. En revanche, elle induit une augmentation de l'expression de p21, celle-ci pouvant être corrélée au blocage du cycle cellulaire en phase S. A noter que la PpIX-dSm seule, sans photoactivation, induit une diminution de l'expression de p21, variation pouvant être corrélée à l'augmentation du taux de cellules en phase G1 dans cette condition. Dans cette lignée cellulaire, l'étude de l'expression et de l'état de phosphorylation de p53 (sérine 15) a permis de démontrer que l'augmentation d'expression de p21 ne dépendait pas de p53, ce qui coïncide avec l'absence de fonctionnalité de p53 dans les cellules DU 145.

Enfin dans les cellules LNCaP (p53 +/+), la photoactivation des PS induit une diminution de l'expression de p53 et de sa forme phosphorylée ainsi qu'une diminution d'expression de p21. La voie p53/p21 étant connu comme inductrice d'un blocage du cycle cellulaire, son inhibition peut être corrélée à la progression des cellules LNCaP dans le cycle cellulaire, même en cas de photoactivation des PS.

Ainsi, la photoactivation des deux PS d'intérêt n'a pas d'effet sur le cycle cellulaire des cellules p53 WT mais induit une accumulation en phase S des cellules mutées pour p53 rendant impossible leur passage en phase G2/M.



Cette même observation a été faite en comparant les effets du Photofrin® sur des fibroblastes humains (p53 WT/WT) et des cellules de Syndrome Li-Fraumeni (p53 mut). Il a été démontré que le Photofrin® induisait un arrêt du cycle en phase G2/M des cellules p53 mutées alors qu'aucun effet sur le cycle cellulaire des cellules p53 WT n'était observé (206).

Malgré cette différence d'effet sur le cycle cellulaire des deux PS d'intérêt, l'étude de la distribution des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire a également permis de mettre en évidence l'apparition d'une population de cellules dites sub-G1 dans les trois lignées cellulaires étudiées. Ces cellules ayant un contenu en ADN étalé dans une zone en deçà de 2N chromosomes en cytométrie ont été identifiées comme des cellules apoptotiques (207).

I.3. Induction de la mort cellulaire programmée ou apoptose

La régulation du cycle cellulaire fait également appel à une étroite surveillance de l'intégrité de la cellule et de ses constituants. Lors de lésions sur l'ADN, le cycle est arrêté au niveau de points de contrôle particuliers appelés checkpoints, pour permettre la réparation des dommages. Après réparation, la cellule poursuit son cycle cellulaire ou, si les lésions sont trop importantes pour être réparées, la cellule entre en apoptose.

L'apoptose est une forme active de mort cellulaire sous contrôle génétique. Selon la nature du signal (intra ou extracellulaire), l'apoptose est orientée selon deux voies principales : la voie des récepteurs de morts (ou voie extrinsèque) et la voie mitochondriale (ou voie intrinsèque).

Dans le cadre de la PDT, la voie apoptotique empruntée est dépendante de la localisation du photosensibilisateur au sein de la cellule. En effet, le principe de la PDT est basé sur la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) suite à la photoactivation des PS et il est connu que ces ROS, et notamment l'oxygène singulet, ont un faible rayon d'action. Ainsi, l'apoptose est essentiellement initiée à partir des dommages oxydants induits par la PDT au niveau des sites de localisation des PS (la mitochondrie, le réticulum endoplasmique, les lysosomes ou parfois même la membrane plasmique étant, en ordre décroissant, les plus susceptibles à ce processus).

Des études ont démontré que la PpIX présente au sein des cellules suite à l'utilisation d'acide-5-aminolévulinique (5-ALA – 90 min) est localisée au sein des mitochondries (208), ce qui coïncide avec la synthèse de PpIX qui a lieu naturellement au sein de la mitochondrie. En revanche, en cas de traitement plus court par le 5-ALA (15 min) suivi d'une incubation sans PS, la PpIX se retrouve de façon diffuse au sein du cytoplasme (208). Cette présente étude a permis de mettre en évidence la localisation cytoplasmique de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm tout en écartant toute co-localisation des PS avec la mitochondrie ou les lysosomes. Ainsi, l'utilisation directe de la PpIX localiserait ce PS non pas au sein d'un organite cellulaire mais au sein du cytoplasme. Néanmoins, dans la présente étude, la localisation des PS ne semble pas diffuse mais assez localisée au sein du cytoplasme voire proche des mitochondries. Il est connu que la PpIX présente une haute affinité pour les récepteurs périphériques des benzodiazépines (PBR) situés au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, ce qui expliquerait que celle-ci soit davantage à l'extérieur des mitochondries qu'à l'intérieur.

Selon la localisation intracellulaire de la PpIX, le type de mort cellulaire induit par la photoactivation de celle-ci diffère : une photoactivation de la PpIX mitochondriale induit



l'apoptose des cellules traitées alors qu'une photoactivation de la PpIX diffuse au sein du cytoplasme induit davantage de nécrose (208). Des études effectuées précédemment au sein du LCSN ont démontré que les deux PS d'intérêt induisaient le processus apoptotique dans les cellules HaCat, MCF-7 (197) et K562 (198).

L'ensemble de ces données a orienté les recherches suivantes vers une possible induction de la voie apoptotique mitochondriale dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines soumises à la photoactivation de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm. Il a été démontré que ces nouveaux PS, une fois photoactivés par la lumière rouge, induisent la production de ROS à l'origine d'une chute rapide du potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules PC-3, DU 145 et LNCaP.

Plusieurs hypothèses concernant l'origine de la chute du potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules apoptotiques ont été avancées et notamment l'ouverture du pore de perméabilité temporaire (PTP) (94–97).

Dans le cadre de la PDT, l'affinité des PS pour la mitochondrie et la forte sensibilité du PTP à l'augmentation du taux de ROS dans le cytosol représentent les causes majeures de l'ouverture du PTP. Ainsi, une ouverture prolongée de celui-ci induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale suivie de la perméabilisation des membranes mitochondriales à l'origine de la libération de molécules pro-apoptotiques dans le cytosol. Les protéines SIMPs libérées telles que le cytochrome c vont participer à l'induction de l'apoptose via l'activation des caspases.

Les protéases de la famille des caspases sont très généralement activées au cours de l'apoptose. On distingue les caspases initiatrices telles que les caspases-8 et -9 activées au cours de l'induction de l'apoptose, et les caspases effectrices, principalement représentées par la caspase-3 qui est activée au cours de la phase d'exécution de l'apoptose.

Cette étude révèle que la photoactivation de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm par la lumière rouge induit l'activation de la caspase 9 et de la caspase 3 dès 24h après l'irradiation des cellules PC-3, DU 145 et LNCaP. L'activation de la caspase 3 conduit au clivage de nombreux substrats cellulaires dont la poly (ADP-ribose) polymérase (PARP), les lamines, les histones H1 ainsi que de nombreuses protéines impliquées dans la survie et la mort des cellules. Dans les cellules PC-3, DU 145 et LNCaP, les deux PS d'intérêt photoactivés induisent un clivage de la protéine PARP rendant celle-ci non fonctionnelle, c'est-à-dire incapable de réparer l'ADN en cas de fragmentation. De plus, la caspase 3 active également en fin d'apoptose des endonucléases qui vont cliver l'ADN en fragments oligonucléosomiques. Cette fragmentation de l'ADN est caractéristique de cellules apoptotiques et la mesure de la génération de fragments oligonucléosomiques permet d'apprécier le pouvoir pro-apoptotique des PS. Ainsi, la PpIX-dSd et la PpIX-dSm induisent, dès 24h, une fragmentation de l'ADN dans les cellules PC-3 et DU 145 avec un fold de 2,1 à 4,6 en comparaison aux cellules témoins. En revanche, le taux de fragmentation de l'ADN est plus faible dans les cellules LNCaP (fold compris en 1,5 et 1,8). Néanmoins, l'utilisation de la N-acétyl-cystéine (NAC), un inhibiteur de la production des ROS, a permis de valider l'implication des ROS dans la fragmentation de l'ADN induite par la photoactivation des PS. Ainsi les résultats présentés jusqu'alors ont démontré que les deux PS nouvellement synthétisés étaient de puissants inducteurs de l'apoptose dans les trois lignées cancéreuses prostatiques humaines étudiées.



L'ensemble de ces résultats permettent de démontrer que l'inhibition de la viabilité cellulaire observée lors des tests de viabilité est due à la fois à un blocage des cellules PC-3 et DU 145 en phase S du cycle cellulaire et à l'induction de l'apoptose dans les trois lignées cancéreuses étudiées.

I.4. Modulation des voies de transduction du signal et de résistance à l'apoptose

Ces mêmes tests ont également permis de calculer les IC_{50} des deux PS dans ces trois lignées. Il semble que la lignée PC-3 soit la plus résistante aux PS puisqu'elle présente des IC_{50} plus élevées que les lignées DU 145 et LNCaP.

Cette différence d'efficacité des PS peut tirer son origine des profils génétiques des lignées cellulaires pour p53. En effet, il a été démontré que les cellules mutées pour p53 sont plus résistantes au Photofrin® que les cellules p53 WT et que la transfection de p53 dans ces cellules mutées permet d'augmenter l'efficacité du Photofrin® (206). Cette observation est en corrélation avec les résultats de Zawacka-Pankau et al. qui démontrent que les cellules p53 +/+ sont plus sensibles à la PpIX que les cellules p53 -/- (209). Ainsi, l'expression de p53 fonctionnelle dans les cellules LNCaP pourrait expliquer la meilleure sensibilité de ces cellules à la PpIX-dSd et à la PpIX-dSm en comparaison aux cellules PC-3 et DU 145 qui sont mutées pour p53. Aussi, contrairement à la lignée DU 145, la lignée cellulaire PC-3 exprime très fortement la cyclooxygénase-2 (COX-2), elle aussi connue comme inductrice d'une résistance aux traitements anti-cancéreux.

C'est à la vue de ces différentes données que la suite de l'étude s'est attachée à déceler une éventuelle activation de voies favorables ou non à l'apoptose dans les cellules PC-3 soumises à la photoactivation des PS.

La prolifération cellulaire et l'apoptose sont régulées par divers stimuli qui activent des voies de transduction du signal qui à leur tour activent des cibles cellulaires. Les principales voies de transduction du signal sont la voie des MAP Kinases, la voie PI3K/Akt et la voie d'activation du facteur de transcription NF- κ B.

Tout d'abord, la voie PI3K/Akt est connue pour favoriser la croissance et la prolifération des cellules. La lignée PC-3 étant déficiente pour PTEN (l'inhibiteur de la PI3K), elle présente une activation constitutive d'Akt, lui conférant un rôle essentiel dans la résistance aux traitements. Cette étude a démontré que la photoactivation de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm induit une diminution de cette activation d'Akt, rendant ainsi les cellules moins résistantes à la PDT.

Néanmoins, d'autres mécanismes peuvent agir en collaboration ou indépendamment d'Akt pour résister aux traitements. C'est notamment le cas du facteur de survie NF- κ B qui est capable de contrôler différents facteurs anti-apoptotiques tels que Bcl-2. Les résultats obtenus révèlent que la photoactivation des PS induit une diminution de l'activation de NF- κ B dès 12h après l'irradiation et induit également une diminution de l'expression de Bcl-2. Il semble donc que cette voie de survie NF- κ B/Bcl-2 ne soit pas activée et donc ne soit pas inductrice d'une résistance à l'apoptose observée. En revanche, malgré son rôle connu dans la survie cellulaire, NF- κ B a également montré des caractéristiques pro-apoptotiques en cas de PDT. En effet, son inhibition a été corrélée à une diminution de l'activation de la caspase 3 (123). Néanmoins, dans cette étude, la photoactivation des PS induit la diminution de l'activation de



NF- κ B mais induit également une augmentation de l'activation de la caspase-3. Il semblerait donc que dans ce modèle, la voie NF- κ B n'exerce pas d'effet pro-apoptotique et donc que son inhibition favorise les effets de la PDT.

La modulation de l'activation des MAPKs, et notamment de la voie de p38, reste un point clé dans la transduction du signal induit par des drogues anti-cancéreuses. Dans le cadre de la PDT, la plupart des PS porphyriniques, tels que le Photofrin® et le 5-ALA, induisent l'activation de la voie p38/MAPK. Son implication dans le processus apoptotique induit par ces PS reste néanmoins dépendante de la lignée cellulaire étudiée. En effet, l'inhibition de la voie p38/MAPK s'est avérée n'avoir aucune influence sur la survie cellulaire en cas de traitement par le Photofrin® (120) et apparaît comme inductrice d'une résistance en cas de traitement par le 5-ALA de patients atteints de cancers épidermoïdes de la peau (122).

Ainsi, comme la plupart des PS, la PpIX polyaminée active la voie p38/MAPK dès 5 min après l'irradiation pour la PpIX-dSm et 20 min pour la PpIX-dSd. Dans les cellules PC-3, l'inhibition de cette voie par utilisation de SB203580 induit une diminution du taux de fragmentation de l'ADN retrouvé en cas de photoactivation des PS. Cette donnée permet de valider le rôle pro-apoptotique de la voie p38/MAPK dans ce modèle d'étude et donc d'écarter toute éventuelle hypothèse de résistance à l'apoptose à travers cette voie.

Ainsi, la modulation des voies telles que PI3K/Akt, NF- κ B et p38/MAPK observée dans ce modèle permet d'affirmer que la PpIX-dSd et la PpIX-dSm permettent d'inhiber des voies connues comme inductrices d'une résistance aux traitements et de favoriser l'activation de voies présentant des caractéristiques pro-apoptotiques. Cette donnée permet d'affirmer que ces deux PS peuvent exercer leur effet maximal sans nécessiter d'être couplés à un inhibiteur d'une voie de résistance à l'apoptose.

Néanmoins, l'inhibition de la voie p38/MAPK a également permis de révéler son implication dans l'activation de la voie COX-2/PGE₂ induite en cas de photoactivation des PS.

La cyclooxygénase-2, une enzyme impliquée dans le métabolisme de l'acide arachidonique, joue un rôle important dans la carcinogenèse prostatique tant par son expression que par son activité enzymatique (210). La COX-2 s'est montrée impliquée dans l'initiation et la promotion tumorales, l'angiogenèse (128), l'invasion tumorale et surtout dans une résistance à l'apoptose à l'origine des échecs thérapeutiques.

De nombreuses recherches suggèrent que l'utilisation d'inhibiteurs de COX-2 permettrait d'inhiber la prolifération cellulaire et de favoriser l'apoptose dans de nombreux types cancéreux. Cela conduit à envisager l'utilisation de ces inhibiteurs dans de futurs protocoles thérapeutiques en association avec une autre drogue anticancéreuse que ce soit dans le cadre de la radiothérapie, la chimiothérapie ou encore la PDT. C'est par exemple le cas dans le modèle du cancer du sein où la PDT induit l'activation de la voie COX-2/PGE₂ à l'origine d'une accumulation du complexe pSer15/p53/COX-2. L'inhibition de l'expression de COX-2 par l'utilisation de petits ARN interférents (siRNA) induit une augmentation de l'activation de p53 et favorise l'apoptose faisant de COX-2 une cible à inhiber pour favoriser les effets de la PDT (211). C'est également le cas dans les cellules murines mammaires traitées avec le Photofrin® : l'utilisation du célécoxib, un inhibiteur sélectif de COX-2, favorise l'induction du processus apoptotique (156). En revanche, aucun lien n'a été établi entre la voie COX-2/PGE₂ et l'apoptose dans les cellules cancéreuses traitées par l'hypéricine (157). Ainsi, les effets des



inhibiteurs de la voie COX-2/PGE₂ semblent dépendre du modèle cellulaire étudié, du PS et de l'inhibiteur utilisés.

Dans la lignée cellulaire PC-3 traitée par la PpIX-dSd ou la PpIX-dSm, l'utilisation de NS-398, un inhibiteur de l'activité de la COX-2, et la diminution de l'expression de COX-2 par transfection de shRNA dans les cellules PC-3, n'ont aucun effet sur l'apoptose induite par la photoactivation des PS d'intérêt. Il semblerait donc que l'activation de cette voie ne soit pas inductrice d'une résistance à la PDT dans ce modèle d'étude.

Une autre voie pouvant être mise en place au cours de thérapies anticancéreuses est l'autophagie. Il s'agit d'un processus catabolique grâce auquel la cellule est capable de recycler ses propres organites et macromolécules par l'intermédiaire des lysosomes.

Dans le cadre de la PDT, l'autophagie peut être inductrice de la survie cellulaire par recyclage des organites endommagés par la photoactivation des PS, et cela notamment pour des PS localisés au niveau de la mitochondrie ou du réticulum endoplasmique. A l'inverse, les PS d'affinité lysosomale présentent plutôt des caractéristiques anti-autophagiques puisqu'ils empêchent la fusion des lysosomes avec l'autophagosome (185).

La PDT stimule l'autophagie préférentiellement par photooxydation et donc inactivation des régulateurs négatifs de la voie autophagique tels que m-TOR et Bcl-2, plutôt que d'agir directement sur les acteurs autophagiques tels que Bécline-1, les protéines Atg ou LC3.

La photoactivation de l'hypéricine, un PS d'affinité réticulaire, induit une inhibition de mTOR à l'origine de l'induction du processus autophagique dans des cellules de cancer du col de l'utérus. L'inhibition de l'autophagie par knockdown d'Atg5 ou par utilisation de la 3-méthyladénine favorise l'induction de l'apoptose. Dans ce modèle, l'autophagie présente donc des caractéristiques anti-apoptotiques (212). L'utilisation de la chlorine e6 sur des cellules cancéreuses colorectales induit à la fois l'apoptose et l'autophagie d'une façon dépendante de p38. L'inhibition de l'autophagie par l'utilisation de la 3-méthyladénine ou de la bafilomycine A1 favorise le processus de mort cellulaire programmée. Ainsi, l'autophagie apparaît comme inductrice d'une résistance à la PDT par la chlorine e6 dans ces cellules (213). L'utilisation de 5-ALA, inducteur de la synthèse de la PpIX d'affinité mitochondriale, induit une augmentation de l'expression des acteurs autophagiques tels que Bécline-1, ATG 7 et LC3 (214) soit une induction de l'autophagie dans les cellules cancéreuses colorectales, mais son rôle dans l'induction de l'apoptose n'a pas encore été déterminé.

Kessel et son équipe ont démontré que les effets de l'autophagie sur l'apoptose pouvaient dépendre de la dose d'irradiation utilisée. En effet, à faible dose de PDT, l'autophagie présente des caractéristiques anti-apoptotiques alors qu'à forte dose, ce processus représente une voie de mort alternative à l'apoptose (191).

Dans notre sujet d'étude, la photoactivation de la PpIX-dSd induit l'activation de la voie AMPK/TSC1/2/mTOR connue comme inhibitrice de l'autophagie. L'activation de cette voie peut être corrélée à la diminution d'expression des acteurs autophagiques tels que Bécline-1 et les protéines ATG. En revanche, une conversion de LC3-I en LC3-II, un marqueur de l'autophagie tardive, est retrouvée en cas de photoactivation des PS.

La protéine ATG7 est impliquée à la fois dans la liaison de LC3-I avec la phosphatidyléthanolamine (PE), générant ainsi LC3-II, mais également dans la formation du



complexe ATG5/ATG12/ATG7 indispensable à l'insertion de LC3-II au sein de la membrane de l'autophagosome (215). Ainsi, il est possible qu'un composant non identifié puisse substituer ATG7 dans la formation de LC3-II ou que le taux résiduel de protéine ATG7 soit suffisant pour former LC3-II.

Selon Cecconi et Levine, l'ensemble des protéines autophagiques est indispensable pour rendre l'autophagie fonctionnelle (215). Il semblerait donc que l'inhibition de l'expression de Bécline-1, des protéines ATG5, 12, 16, 7 et 3, retrouvée en cas de photoactivation de la PpIX polyaminée rende ce processus non fonctionnel malgré la présence de LC3-II. En effet, la protéine LC3-II serait présente mais serait incapable de s'insérer dans la membrane de l'autophagosome du fait de l'inhibition d'expression des protéines ATG.

Ce même phénomène est retrouvé dans les travaux de Xue et al. qui démontrent qu'en réponse à la PDT par la Pc4, les cellules de cancer du sein MCF-7 déficientes pour ATG7 restent capables d'accumuler LC3-II mais qu'elles sont incapables, en comparaison aux cellules MCF-7 positives pour ATG7, de former l'autophagosome (216).

A partir de ces données, il peut être envisagé que, dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines traitées par la PpIX-polyaminée photoactivée, le processus autophagique n'est pas fonctionnel et donc incapable d'induire une éventuelle résistance à l'apoptose.

L'ensemble de ces résultats permet d'affirmer que ces PS nouvellement synthétisés ont la capacité d'induire la mort cellulaire programmée des cellules cancéreuses prostatiques humaines sans activer des voies impliquées dans une résistance à l'apoptose connues jusqu'alors telles que la voie Akt, le facteur de survie NF- κ B, la voie COX-2/PGE₂ (ici activée mais non impliquée dans un phénomène de résistance) et la voie autophagique.



Chapitre II. Etude *in vivo* des effets de nouveaux photosensibilisateurs pour le traitement du cancer de la prostate par photothérapie dynamique

Des expérimentations effectuées *in vivo* basées sur les xénogreffes de cellules PC-3 à des souris nudes ont permis d'étudier les effets des deux PS nouvellement synthétisés au sein d'un modèle murin et d'un véritable environnement tumoral.

L'efficacité des conjugués PpIX-polyamines a été comparée à celle de la PpIX seule afin de démontrer l'intérêt de sa vectorisation avec la spermidine ou encore la spermine.

Suite au traitement des souris par les PS, la mesure des volumes tumoraux a permis de mettre en évidence la différence d'efficacité des PS selon leur état de vectorisation en cas de photoactivation par la lumière rouge et l'absence de toxicité des PS en absence d'irradiation.

Xiao et son équipe ont démontré en 2007 que la PDT fractionnée présentait une meilleure efficacité que la PDT continue. En effet, suite à la greffe d'adénocarcinome prostatique sur des rats Copenhague (Dunning R3327-AT et H) et au traitement des rats par la vertéporfine, une illumination ON/OFF pourrait théoriquement permettre une réoxygénation des tissus traités et améliorer l'efficacité du traitement (217). C'est à partir de cette donnée que la photoactivation *in vivo* de la PpIX seule ou polyaminée s'est effectuée. En effet, l'irradiation se compose de deux séquences de 5 min espacées d'une pause de 5 minutes, dans le but d'améliorer les effets des PS.

En cas de photoactivation par la lumière rouge, la PpIX seule utilisée à une dose de 10 mg/kg n'a pas d'effet sur le volume tumoral. A cette même dose, son couplage à la spermidine permet d'induire un ralentissement de la croissance tumorale alors que son couplage à la spermine n'améliore pas son efficacité. Il semble donc que, selon la polyamine choisie comme vecteur, l'efficacité des PS diffère. Cette différence de cytotoxicité selon la polyamine-vecteur a déjà été mise en évidence dans le cas de la vectorisation de l'acridine. En effet, tout comme la PpIX, l'acridine présente une cytotoxicité plus importante lorsqu'elle est couplée à la spermidine, en comparaison à la spermine. Cette différence s'est justifiée par la différence d'affinité des conjugués acridine-polyamine pour le système de transport des polyamines (PTS). En effet, des études *in vitro* par microscopie ont mis en évidence l'internalisation des composés couplés à la spermidine alors que ceux avec la spermine étaient liés plus fortement à la cellule sans entrer dans celle-ci (73). Cette différence de capture de ces composés s'expliquerait par le nombre de charges positives plus important sur la spermine, favorisant ainsi la liaison à d'autres composés de la membrane plasmique, retardant ainsi son transport.

Ces résultats quant aux effets des PS sur la croissance tumorale ont pu être mis en corrélation avec l'étude de la prolifération cellulaire et du processus apoptotique. En effet, c'est uniquement en cas de photoactivation de la PpIX-dSd qu'une diminution du marquage au Ki67 a été remarquée ainsi qu'une diminution du marquage de Bcl-2, une protéine anti-apoptotique. Ce ralentissement de la croissance tumorale retrouvé serait donc dû à une diminution de la prolifération cellulaire et l'induction de l'apoptose au sein de la tumeur traitée et irradiée.

Suivant l'hypothèse selon laquelle la PpIX-dSm aurait davantage d'affinité pour la membrane cellulaire et entrerait donc moins dans la cellule, il est envisageable qu'au bout de 24h, la PpIX vectorisée à la spermine soit éliminée plus rapidement de l'organisme de la souris. Cette différence d'efficacité entre la PpIX-dSd et la PpIX-dSm retrouvée *in vivo* n'avait pas été retrouvée *in vitro* ce qui pourrait s'expliquer par l'absence d'élimination du PS durant les 24h



de traitement. Un contact direct des cellules avec le milieu contenant la PpIX-dSm, et ce durant 24h, rend possible l'entrée dans la cellule de la PpIX-dSm par d'autres moyens que le PTS ou encore, son attachement à la membrane plasmique suffirait à induire la mort des cellules tumorales.

La PpIX-dSd présente ainsi des caractéristiques intéressantes quant à son utilisation dans le cadre du traitement du cancer de la prostate par PDT.

Les polyamines étant connues pour leur implication dans la prolifération cellulaire, il était possible d'envisager que leur présence au sein de la tumeur, sans activation du PS, puisse favoriser la croissance tumorale. Or, ces expérimentations *in vivo* ont démontré que la PpIX-dSd n'a aucun effet sur les tumeurs en absence de photoactivation, aucune augmentation du volume tumorale n'est révélée. Ainsi, toute inquiétude quant à l'éventuel effet pro-tumoral du PS sur des métastases non détectées chez le patient et donc non irradiées, peut hypothétiquement être écartée. D'éventuelles expérimentations complémentaires permettraient de valider cette hypothèse.



CONCLUSION ET PERSPECTIVES



Ce projet de recherche s'inscrivant dans la continuité d'un travail de synthèse et de caractérisation de nouveaux PS entrepris au sein du LCSN, a permis d'étudier les effets de la PpIX-dSd et de la PpIX-dSm dans un modèle de cancer de la prostate.

Tout d'abord, une étude *in vitro* a permis de vérifier que ces nouveaux PS répondaient aux autres caractéristiques attendues d'un PS : une toxicité nulle ou faible à l'obscurité, une sélectivité tumorale, la capacité d'induire la mort des cellules tumorales sans induire de résistance aux traitements.

Dans un premier temps, nous avons mis en évidence l'intérêt de la vectorisation de la PpIX par des polyamines quant au ciblage des cellules tumorales en démontrant une meilleure efficacité de la PpIX polyaminée en comparaison à la PpIX seule et également une meilleure efficacité de nos deux PS d'intérêt dans les cellules cancéreuses en comparaison aux cellules saines.

Nous avons également démontré que les PS induisent un arrêt du cycle cellulaire dans les cellules PC-3 et DU 145. En effet, la photoactivation des PS par la lumière rouge induit une accumulation des cellules en phase S du cycle cellulaire. Dans ces mêmes conditions, les PS induisent également la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) responsables de l'induction de l'apoptose dans les cellules PC-3, DU 145 et LNCaP. En effet, ces PS induisent une chute du potentiel membranaire mitochondrial, l'activation de la caspase 9 et de la caspase 3, le clivage de la protéine PARP et la fragmentation de l'ADN dans ces trois lignées. Tous ces événements indiquent que la PpIX-dSd et la PpIX-dSm sont de puissants inducteurs de l'apoptose dans les lignées cancéreuses prostatiques humaines.

Plusieurs hypothèses concernant l'origine de la chute du potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules apoptotiques ont été avancées et notamment l'ouverture du pore de perméabilité temporaire (PTP). Dans le cadre de la PDT, l'affinité des PS pour la mitochondrie et la forte sensibilité du PTP à l'augmentation du taux de ROS dans le cytosol représentent les causes majeures de l'ouverture du PTP. Ainsi, une ouverture prolongée de celui-ci induit une dépolarisation de la membrane mitochondriale suivie de la perméabilisation des membranes mitochondriales à l'origine de la libération de molécules pro-apoptotiques dans le cytosol. Les protéines SIMPs libérées telles que le cytochrome c vont participer à l'induction de l'apoptose via l'activation des caspases. Afin de valider une éventuelle implication du PTP dans l'apoptose induite par nos deux PS, l'utilisation d'inhibiteur de celui-ci peut être envisagée grâce à l'utilisation de l'acide bongkréique (un agent bloquant l'unité ANT du PTP), la cyclosporine A ou encore la trifluopérazine. Si l'utilisation de ces inhibiteurs permet de restaurer le potentiel membranaire mitochondrial des cellules, l'implication du PTP dans l'apoptose induite par la PpIX-dSd et la PpIX-dSm pourrait être validée.

Au cours de cette apoptose induite par ces PS, nous avons également démontré une diminution de l'activité des voies généralement impliquées dans la survie cellulaire (la voie PI3K/Akt et la voie du facteur de transcription NF- κ B). Il a également été mis en évidence une activation de la voie p38/MAPK qui exerce à la fois son rôle de voie pro-apoptotique et son rôle de régulateur positif de la voie COX-2/PGE₂. L'activation de cette voie enzymatique a été retrouvée dans de nombreux cas de traitement de cellules cancéreuses par la PDT, caractérisant cette voie comme inductrice d'une résistance à l'apoptose. Dans notre modèle, contrairement à la plupart des PS actuellement utilisés, cette activation de la voie COX-2/PGE₂ ne semble avoir aucun lien avec l'apoptose.



D'autre part, une activation de la voie AMPK/TSC1/2/mTOR semble inhiber l'expression des acteurs clés de la voie autophagique (Bécline-1, les protéines ATG). Néanmoins, une conversion de LC3-I en LC3-II a été retrouvée en cas de photoactivation des PS. Il est connu que ce sont les protéines ATG, et plus spécifiquement la protéine ATG7, qui sont responsables de la conversion de LC3-I en LC3-II. Dans notre cas, il est possible qu'un composant non identifié puisse substituer les protéines ATG dans la formation de LC3-II ou que le taux résiduel de protéine ATG7 soit suffisant pour former LC3-II. De plus, ces protéines de l'autophagie précoce sont également impliquées dans l'insertion de LC3-II au sein de la membrane de l'autophagosome. La diminution d'expression de ces protéines rendrait impossible cette insertion de LC3-II et rendrait donc le processus autophagique non fonctionnel (215). Pour valider cette hypothèse, l'observation par microscopie électronique à transmission (MET) des cellules traitées par PDT permettrait de distinguer la présence ou non de vacuoles caractéristiques d'une autophagie fonctionnelle. Aussi, afin de savoir si cette conversion de LC3-I en LC3-II est suffisante pour induire une éventuelle résistance à l'apoptose, l'utilisation de la bafilomycine A1, un inhibiteur sélectif des ATPases vacuolaires, ou de la chloroquine qui entre dans les lysosomes par diffusion passive, peut être envisagée. Ces inhibiteurs permettent d'augmenter le pH au sein des lysosomes, d'inhiber leur fonctionnalité et leur fusion avec l'autophagosome. L'étude des effets du blocage de la fusion lysosome/autophagosome sur le taux de fragmentation de l'ADN permettrait de déceler un éventuel lien entre autophagie et apoptose.

Enfin, il reste à noter une différence de sensibilité à la PpIX-dSd et à la PpIX-dSm dans les trois lignées cancéreuses prostatiques humaines étudiées. Une hypothèse selon laquelle cette différence de sensibilité viendrait de leur différence de profil d'expression de p53 a été émise. En effet, la littérature révèle que p53 joue à la fois un rôle dans le cycle cellulaire, l'apoptose et l'autophagie retrouvés en cas de PDT.

La lignée PC-3 (p53 -/-) apparaît comme la lignée la plus résistante à la PpIX-dSd et à la PpIX-dSm du fait de son IC_{50} plus élevée. L'étude des effets de la transfection de p53 dans les cellules PC-3 (p53 -/-) sur le taux de fragmentation de l'ADN induite par la PDT permettrait de conclure quant au rôle de p53 sur l'apoptose. En effet, si ces cellules deviennent plus sensibles aux PS en cas d'augmentation de l'expression de p53, son rôle dans la sensibilisation des cellules cancéreuses à la PDT serait alors mis en évidence.

De plus, dans notre modèle, la lignée cellulaire LNCaP (p53 +/+) est plus sensible à la PDT (IC_{50} plus faible) mais le taux de fragmentation de l'ADN retrouvé en cas d'apoptose reste néanmoins plus faible que dans les autres lignées. Il est possible d'envisager l'implication d'un autre type de mort cellulaire tel que la nécrose. Pour valider cette hypothèse, un marquage des cellules à l'annexine V et à l'iodure de propidium des cellules traitées par PDT suivi d'une étude par cytométrie en flux permettrait de comparer la proportion de cellules apoptotiques et de cellules nécrotiques.

Le carcinome prostatique a été initialement décrit comme se développant à partir des cellules épithéliales des glandes dites principales, situées dans la zone centrale de la prostate. En effet, on note un fort avantage prolifératif ainsi qu'un déficit d'apoptose dans ce compartiment cellulaire. Cependant, l'initiation du cancer prostatique pourrait avoir lieu plus en amont, dans les cellules souches situées dans la membrane basale de la glande



prostatique (218). Il existe en effet une forte surexpression du PSCA (Prostate stem cell antigen), exprimé par les cellules basales, dans 88% des carcinomes prostatiques (219). Il pourrait aussi être initié au niveau des cellules souches épithéliales lumineales (220). Les cellules souches cancéreuses ne sont pas encore parfaitement décrites et caractérisées. Néanmoins, celles du compartiment basal n'expriment pas les récepteurs aux androgènes, ce qui les rend insensibles aux traitements hormonaux, et expriment de forts niveaux d'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2, ce qui les rend peu sensibles aux autres thérapies (221). En effet, il a été démontré qu'en comparaison aux cellules cancéreuses prostatiques différenciées, les cellules souches prostatiques sont résistantes à la radiothérapie, ce qui pourrait expliquer la récurrence du cancer. Frame et al. ont démontré que la PDT est efficace sur ces cellules souches et qu'elle induit leur mort via les processus de nécrose et d'autophagie (222). Il serait donc intéressant de tester les effets des conjugués PpIX-polyamines sur des cellules souches prostatiques.

Enfin, des expérimentations effectuées *in vivo* basées sur les xénogreffes de cellules PC-3 à des souris nues ont permis d'étudier les effets des deux PS nouvellement synthétisés au sein d'un modèle murin et d'un véritable environnement tumoral.

Les effets de la PpIX couplée à la spermidine ont révélé que la vectorisation du PS par cette polyamine permet d'augmenter l'efficacité de la PpIX. En revanche, la spermine ne semble pas favoriser les effets de la PpIX. Afin de comprendre si cette différence entre ces deux couplages est due à la différence d'affinité des conjugués PpIX-polyamine pour le système de transport des polyamines (PTS) et donc à une différence quant à l'entrée des PS dans la cellule tumorale, le dosage des PS au sein des tumeurs est envisagé. En effet, 24h après le traitement des souris nues par les PS, les tumeurs peuvent être récupérées afin d'effectuer un dosage des PS. Pour cela, des coupes tumorales peuvent être effectuées et observées au microscope confocal afin de quantifier la fluorescence naturelle de chaque PS au sein de la tumeur. De plus, comme l'ont effectué Di Venosa et al. chez des souris nues traitées par des dérivés de 5-ALA, le dosage de la PpIX pourrait être effectué à la fois dans les tumeurs et différents organes de l'animal (223).

Ces manipulations *in vivo* ont permis de démontrer que la PpIX-dSd induisait un ralentissement de la croissance tumorale dû à une inhibition de la prolifération cellulaire et à l'induction de l'apoptose dans ces cellules tumorales. Webber et al. ont également mis en évidence la capacité de la PpIX à induire le processus apoptotique de cellules cancéreuses colorectales xénogreffées à des souris nues lorsque celle-ci était photoactivée par la lumière rouge (100 J/cm^2) (224). Yamamoto et al. ont également mis en évidence l'induction du processus apoptotique par la PpIX dans des cellules de glioblastomes chez des rats traités par le 5-ALA (225). Les résultats de la présente étude restent donc en adéquation avec la littérature.

Néanmoins, il est important de noter que la PpIX-dSd n'induit pas une inhibition complète de la croissance tumorale mais un ralentissement. Il serait intéressant de réitérer ces expérimentations *in vivo* en les complétant par des expérimentations mettant en jeu de multiples sessions de PDT : une injection de PS suivie de plusieurs irradiations ou encore une injection de PS suivie d'une irradiation 24h après, suivie par une nouvelle injection de PS et une nouvelle irradiation. Ces sessions multiples permettraient de photoactiver plusieurs fois le PS toujours présent au sein de la tumeur.



Néanmoins, le mode d'irradiation utilisé ne permet pas d'irradier l'ensemble de la tumeur et donc de photoactiver la totalité de la quantité de PS présent dans la tumeur. En effet, un seul côté de la tumeur est irradiable. Ainsi, perfectionner le modèle animal utilisé permettrait d'améliorer les effets des PS. Des greffes de cellules cancéreuses prostatiques pourraient être envisagées de manière hétérotopique (sous cutanée) ou orthotopique (au sein de la prostate) chez des rats Copenhague mâles. Après obtention de la taille de tumeur requise pour le traitement, l'injection des PS pourrait être envisagée par voie intraveineuse, toujours dans le but d'évaluer la capacité des polyamines à cibler la tumeur. Enfin, sous contrôle échographique ou IRM, l'utilisation d'un laser diode couplé à une fibre optique avec une partie diffusante permettrait d'effectuer une irradiation intratumorale plus homogène de la tumeur.

Cependant, les modèles de xéno greffes ont le désavantage de manquer d'interaction physiologique entre l'hôte et la tumeur, en partie parce que le système immunitaire affaibli de ces animaux ne force pas la tumeur à exprimer les mécanismes d'échappement qui interviennent chez l'Homme. Ces données orientent la recherche vers d'autres modèles animaux.

Dans le cadre du cancer de la prostate, les carcinomes de prostate spontanés sont rares chez les rongeurs. Cependant, certaines souches de rats ont une incidence élevée de néoplasmes prostatiques, dont les rats Lobund Wistar. Jusqu'à 30 % des rats âgés de cette souche développent un carcinome prostatique. Leur haute concentration de testostérone circulante peut les prédisposer au développement d'adénocarcinomes androgène-dépendant. Les adénocarcinomes de la prostate peuvent être induits chez les rats Lobund Wistar avec des combinaisons méthylnitrosourée (MNU)/testostérone. En effet, cette combinaison augmente l'incidence de cette tumeur et diminue l'âge de survenue : approximativement 90% des rats développent un carcinome de prostate à 12 mois (226). Ce modèle animal pourrait être utile dans le cadre de la PDT par la PpIX-dSd et la PpIX-dSm afin d'étudier les effets de ces PS sur le micro-environnement tumoral.

Les polyamines étant connues pour leur implication dans la prolifération cellulaire, il était possible d'envisager que leur présence au sein de la tumeur, sans activation du PS, puisse favoriser la croissance tumorale. Or, ces expérimentations in vivo ont démontré que la PpIX-dSd n'a aucun effet sur les tumeurs en absence de photoactivation, aucune augmentation du volume tumorale n'est révélée. L'hypothèse selon laquelle ces PS ne présenteraient aucun effet pro-tumoral sur des métastases non détectées et donc non irradiées, reste à étudier. Ainsi, l'utilisation de la sous-lignée insensible aux androgènes MAT-Ly-Lu (Metastatic Anaplastic Tumor metastasizing to Lymph node and Lungs) du carcinome prostatique de rat Dunning (R3327) pourrait être envisagée dans le but d'obtenir la formation de métastases chez l'animal. Leur injection par voie intraveineuse via la veine caudale chez des rats Copenhague mâles induit une croissance tumorale métastatique dans la région lombaire de la colonne vertébrale (227). Ainsi, l'effet anti-tumoral de ces PS sur la tumeur principale irradiée et l'absence d'effet pro-tumoral de ces PS sur des métastases non irradiées pourraient être validés grâce à ce modèle.



Plutôt que d'être envisagée comme un traitement à part entière, la PDT peut représenter un traitement qui viendrait en complément d'une thérapie anticancéreuse actuellement utilisée en routine pour pallier à la résistance mise en place lors de ceux-ci.

L'ensemble de cette étude a démontré que les deux PS nouvellement synthétisés, et notamment la PpIX-dSd répondent aux critères idéaux attendus d'un PS : une composition pure, une absence de toxicité en absence de lumière, une sélectivité vis-à-vis des cellules tumorales, la capacité d'induire la mort de ces cellules et l'absence d'induction de voies de résistance à l'apoptose. Ainsi, la PpIX-dSd apparaît comme un bon candidat dans le cadre de la PDT et laisse envisager de nouvelles perspectives de mis au point pour son utilisation dans le cadre du traitement du cancer de la prostate.



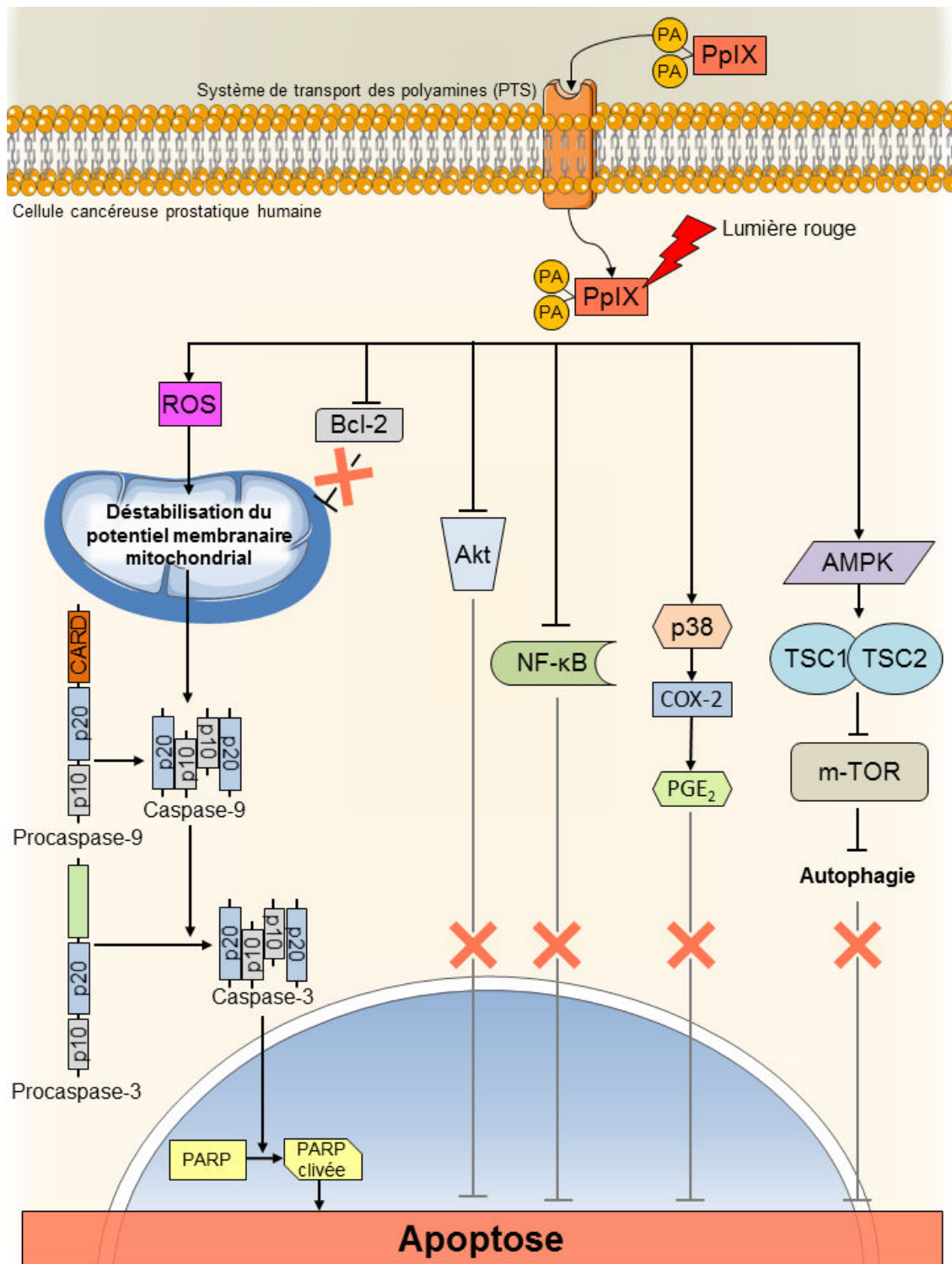


Figure bilan – Effets de la protoporphyrine IX polyaminée dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines.

Les polyamines représentent un bon outil de vectorisation des photosensibilisateurs quant au ciblage des cellules tumorales. Une fois au sein de la cellule, le PS photoactivé induit la production de ROS à l'origine du processus apoptotique via la voie intrinsèque. Les voies de survie telles que la voie Akt et le facteur de transcription NF-κB sont inhibées. La voie p38/COX-2/PGE₂ est activée mais n'est pas impliquée dans un phénomène de résistance dans ce modèle. L'inhibition de la voie AMPK permet l'activation de m-TOR, un inhibiteur de la voie autophagique, connue comme inhibitrice de l'apoptose. Ainsi, la PpIX polyaminée induit l'apoptose sans activation, en parallèle, de voies de résistance.



REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

1. Bok RA, Small EJ. Bloodborne biomolecular markers in prostate cancer development and progression. *Nat Rev Cancer*. 2002 Dec;2(12):918–26.
2. De Marzo AM, Platz EA, Sutcliffe S, Xu J, Grönberg H, Drake CG, et al. Inflammation in prostate carcinogenesis. *Nat Rev Cancer*. 2007 Apr;7(4):256–69.
3. Rébillard X, Grosclaude P, Leuret T, Patard J-J, Pfister C, Richaud P, et al. [Projected incidence and mortality from urologic cancer in France in 2010.]. *Prog En Urol J Assoc Fr Urol Société Fr Urol*. 2010 Nov;20 Suppl 4:S211-214.
4. Delahunt B, Miller RJ, Srigley JR, Evans AJ, Samaratunga H. Gleason grading: past, present and future. *Histopathology*. 2012 Jan;60(1):75–86.
5. Stenman UH, Leinonen J, Alfthan H, Rannikko S, Tuhkanen K, Alfthan O. A complex between prostate-specific antigen and alpha 1-antichymotrypsin is the major form of prostate-specific antigen in serum of patients with prostatic cancer: assay of the complex improves clinical sensitivity for cancer. *Cancer Res*. 1991 Jan 1;51(1):222–6.
6. Balk SP, Ko Y-J, Bubley GJ. Biology of prostate-specific antigen. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2003 Jan 15;21(2):383–91.
7. Parsons JK, Partin AW. Applying complexed prostate-specific antigen to clinical practice. *Urology*. 2004 May;63(5):815–8.
8. Bennett NC, Gardiner RA, Hooper JD, Johnson DW, Gobe GC. Molecular cell biology of androgen receptor signalling. *Int J Biochem Cell Biol*. 2010 Jun;42(6):813–27.
9. Han G, Buchanan G, Ittmann M, Harris JM, Yu X, Demayo FJ, et al. Mutation of the androgen receptor causes oncogenic transformation of the prostate. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Jan 25;102(4):1151–6.
10. Xu Y, Chen S-Y, Ross KN, Balk SP. Androgens induce prostate cancer cell proliferation through mammalian target of rapamycin activation and post-transcriptional increases in cyclin D proteins. *Cancer Res*. 2006 Aug 1;66(15):7783–92.
11. Balk SP, Knudsen KE. AR, the cell cycle, and prostate cancer. *Nucl Recept Signal*. 2008;6:e001.
12. Burton DGA, Giribaldi MG, Munoz A, Halvorsen K, Patel A, Jorda M, et al. Androgen deprivation-induced senescence promotes outgrowth of androgen-refractory prostate cancer cells. *PLoS One*. 2013;8(6):e68003.
13. Eto M, Bennouna J, Hunter OC, Hershberger PA, Kanto T, Johnson CS, et al. C16 ceramide accumulates following androgen ablation in LNCaP prostate cancer cells. *The Prostate*. 2003 Sep 15;57(1):66–79.



14. Murillo H, Huang H, Schmidt LJ, Smith DI, Tindall DJ. Role of PI3K signaling in survival and progression of LNCaP prostate cancer cells to the androgen refractory state. *Endocrinology*. 2001 Nov;142(11):4795–805.
15. Cheng L, Zhang S, Sweeney CJ, Kao C, Gardner TA, Eble JN. Androgen withdrawal inhibits tumor growth and is associated with decrease in angiogenesis and VEGF expression in androgen-independent CWR22Rv1 human prostate cancer model. *Anticancer Res*. 2004 Aug;24(4):2135–40.
16. Holzbeierlein JM, Castle E, Thrasher JB. Complications of androgen deprivation therapy: prevention and treatment. *Oncol Williston Park N*. 2004 Mar;18(3):303-309, 315, 319–21.
17. Ahmed M, Li L-C. Adaptation and clonal selection models of castration-resistant prostate cancer: current perspective. *Int J Urol Off J Jpn Urol Assoc*. 2013 Apr;20(4):362–71.
18. Green SM, Mostaghel EA, Nelson PS. Androgen action and metabolism in prostate cancer. *Mol Cell Endocrinol*. 2012 Sep 5;360(1–2):3–13.
19. Zhang L, Altuwaijri S, Deng F, Chen L, Lal P, Bhanot UK, et al. NF-kappaB regulates androgen receptor expression and prostate cancer growth. *Am J Pathol*. 2009 Aug;175(2):489–99.
20. Incrocci L. Radiotherapy for prostate cancer and sexual health. *Transl Androl Urol*. 2015 Apr;4(2):124–30.
21. Tannock IF, de Wit R, Berry WR, Horti J, Pluzanska A, Chi KN, et al. Docetaxel plus prednisone or mitoxantrone plus prednisone for advanced prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 7;351(15):1502–12.
22. Petrylak DP, Tangen CM, Hussain MHA, Lara PN, Jones JA, Taplin ME, et al. Docetaxel and estramustine compared with mitoxantrone and prednisone for advanced refractory prostate cancer. *N Engl J Med*. 2004 Oct 7;351(15):1513–20.
23. Recine F, Sternberg CN. Hormonal therapy and chemotherapy in hormone-naive and castration resistant prostate cancer. *Transl Androl Urol*. 2015 Jun;4(3):355–64.
24. Onik G, Vaughan D, Lotenfoe R, Dineen M, Brady J. The “male lumpectomy”: focal therapy for prostate cancer using cryoablation results in 48 patients with at least 2-year follow-up. *Urol Oncol*. 2008 Oct;26(5):500–5.
25. Madersbacher S, Pedevilla M, Vingers L, Susani M, Marberger M. Effect of high-intensity focused ultrasound on human prostate cancer *in vivo*. *Cancer Res*. 1995 Aug 1;55(15):3346–51.
26. Djavan B, Zlotta AR, Susani M, Heinz G, Shariat S, Silverman DE, et al. Transperineal radiofrequency interstitial tumor ablation of the prostate: correlation of magnetic resonance imaging with histopathologic examination. *Urology*. 1997 Dec;50(6):986-992-993.
27. Patriarca C, Bergamaschi F, Gazzano G, Corrada P, Ordesi G, Zanitzer L, et al. Histopathological findings after radiofrequency (RITA) treatment for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2006;9(3):266–9.
28. Onik G, Mikus P, Rubinsky B. Irreversible Electroporation: Implications for Prostate Ablation. *Technol Cancer Res Treat*. 2007 Aug 1;6(4):295–300.



29. Lindner U, Lawrentschuk N, Weersink RA, Davidson SRH, Raz O, Hlasny E, et al. Focal laser ablation for prostate cancer followed by radical prostatectomy: validation of focal therapy and imaging accuracy. *Eur Urol.* 2010 Jun;57(6):1111–4.
30. Lindner U, Lawrentschuk N, Trachtenberg J. Focal laser ablation for localized prostate cancer. *J Endourol Endourol Soc.* 2010 May;24(5):791–7.
31. Gray MJ, Lipson R, Maeck JV, Parker L, Romeyn D. Use of hematoporphyrin derivative in detection and management of cervical cancer. *Am J Obstet Gynecol.* 1967 Nov 15;99(6):766–71.
32. Kriegmair M, Zaak D, Stepp H, Stepp H, Baumgartner R, Knuechel R, et al. Transurethral resection and surveillance of bladder cancer supported by 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence endoscopy. *Eur Urol.* 1999 Nov;36(5):386–92.
33. Lipson RL, Baldes EJ, Gray MJ. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. *Cancer.* 1967 Dec;20(12):2255–7.
34. Leonard JR, Beck WL. Hematoporphyrin fluorescence: an aid in diagnosis of malignant neoplasms. *The Laryngoscope.* 1971 Mar;81(3):365–72.
35. Triesscheijn M, Baas P, Schellens JHM, Stewart FA. Photodynamic Therapy in Oncology. *The Oncologist.* 2006 Oct 1;11(9):1034–44.
36. Webber J, Kessel D, Fromm D. Side effects and photosensitization of human tissues after aminolevulinic acid. *J Surg Res.* 1997 Feb 15;68(1):31–7.
37. Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. *Photochem Photobiol.* 1991 Nov;54(5):659.
38. Redmond RW, Kochevar IE. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. *Photochem Photobiol.* 2006 Oct;82(5):1178–86.
39. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol.* 2002 Jan;1(1):1–21.
40. Bagdonas S, Ma LW, Iani V, Rotomskis R, Juzenas P, Moan J. Phototransformations of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX *in vitro*: a spectroscopic study. *Photochem Photobiol.* 2000 Aug;72(2):186–92.
41. Karioti A, Bilia AR. Hypericins as potential leads for new therapeutics. *Int J Mol Sci.* 2010;11(2):562–94.
42. Dougherty TJ, Potter WR, Weishaupt KR. The structure of the active component of hematoporphyrin derivative. *Prog Clin Biol Res.* 1984;170:301–14.
43. Schuitmaker JJ, Baas P, van Leengoed HL, van der Meulen FW, Star WM, van Zandwijk N. Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. *J Photochem Photobiol B.* 1996 Jun;34(1):3–12.
44. Sutedja T, Baas P, Stewart F, van Zandwijk N. A pilot study of photodynamic therapy in patients with inoperable non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer Oxf Engl.* 1990. 1992;28A(8–9):1370–3.



45. Nseyo UO, DeHaven J, Dougherty TJ, Potter WR, Merrill DL, Lundahl SL, et al. Photodynamic therapy (PDT) in the treatment of patients with resistant superficial bladder cancer: a long-term experience. *J Clin Laser Med Surg*. 1998 Feb;16(1):61–8.
46. Bonnett R, White RD, Winfield UJ, Berenbaum MC. Hydroporphyrins of the meso-tetra(hydroxyphenyl)porphyrin series as tumour photosensitizers. *Biochem J*. 1989 Jul 1;261(1):277–80.
47. Nyman ES, Hynninen PH. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 2004 Jan 23;73(1–2):1–28.
48. D’Cruz AK, Robinson MH, Biel MA. mTHPC-mediated photodynamic therapy in patients with advanced, incurable head and neck cancer: a multicenter study of 128 patients. *Head Neck*. 2004 Mar;26(3):232–40.
49. Tan IB, Dolivet G, Ceruse P, Vander Poorten V, Roest G, Rauschnig W. Temoporfin-mediated photodynamic therapy in patients with advanced, incurable head and neck cancer: A multicenter study. *Head Neck*. 2010 Dec;32(12):1597–604.
50. Moore CM, Nathan TR, Lees WR, Mosse CA, Freeman A, Emberton M, et al. Photodynamic therapy using meso tetra hydroxy phenyl chlorin (mTHPC) in early prostate cancer. *Lasers Surg Med*. 2006 Jun;38(5):356–63.
51. Nathan TR, Whitelaw DE, Chang SC, Lees WR, Ripley PM, Payne H, et al. Photodynamic therapy for prostate cancer recurrence after radiotherapy: a phase I study. *J Urol*. 2002 Oct;168(4 Pt 1):1427–32.
52. Lustig RA, Vogl TJ, Fromm D, Cuenca R, Alex Hsi R, D’Cruz AK, et al. A multicenter Phase I safety study of intratumoral photoactivation of talaporfin sodium in patients with refractory solid tumors. *Cancer*. 2003 Oct 15;98(8):1767–71.
53. Verigos K, Stripp DCH, Mick R, Zhu TC, Whittington R, Smith D, et al. Updated results of a phase I trial of motexafin lutetium-mediated interstitial photodynamic therapy in patients with locally recurrent prostate cancer. *J Environ Pathol Toxicol Oncol Off Organ Int Soc Environ Toxicol Cancer*. 2006;25(1–2):373–87.
54. Patel H, Mick R, Finlay J, Zhu TC, Rickter E, Cengel KA, et al. Motexafin lutetium-photodynamic therapy of prostate cancer: short- and long-term effects on prostate-specific antigen. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 Aug 1;14(15):4869–76.
55. Azzouzi A-R, Lebdaï S, Benzaghrou F, Stief C. Vascular-targeted photodynamic therapy with **TOOKAD® Soluble** in localized prostate cancer: standardization of the procedure. *World J Urol*. 2015 Jul;33(7):937–44.
56. Calzavara-Pinton PG, Venturini M, Sala R. Photodynamic therapy: update 2006. Part 2: Clinical results. *J Eur Acad Dermatol Venereol JEADV*. 2007 Apr;21(4):439–51.
57. Miller JD, Baron ED, Scull H, Hsia A, Berlin JC, McCormick T, et al. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Nov 1;224(3):290–9.



58. Juzeniene A, Peng Q, Moan J. Milestones in the development of photodynamic therapy and fluorescence diagnosis. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol*. 2007 Dec;6(12):1234–45.
59. Kurwa HA, Yong-Gee SA, Seed PT, Markey AC, Barlow RJ. A randomized paired comparison of photodynamic therapy and topical 5-fluorouracil in the treatment of actinic keratoses. *J Am Acad Dermatol*. 1999 Sep;41(3 Pt 1):414–8.
60. Peng Q, Soler AM, Warloe T, Nesland JM, Giercksky KE. Selective distribution of porphyrins in skin thick basal cell carcinoma after topical application of methyl 5-aminolevulinate. *J Photochem Photobiol B*. 2001 Sep 15;62(3):140–5.
61. Liu T, Wu LY, Choi JK, Berkman CE. *In vitro* targeted photodynamic therapy with a pyropheophorbide--a conjugated inhibitor of prostate-specific membrane antigen. *The Prostate*. 2009 May 1;69(6):585–94.
62. Jankun J. Protein-based nanotechnology: antibody conjugated with photosensitizer in targeted anticancer photoimmunotherapy. *Int J Oncol*. 2011 Oct;39(4):949–53.
63. Deng H, Bloomfield VA, Benevides JM, Thomas GJ. Structural basis of polyamine-DNA recognition: spermidine and spermine interactions with genomic B-DNAs of different GC content probed by Raman spectroscopy. *Nucleic Acids Res*. 2000 Sep 1;28(17):3379–85.
64. Laitinen J, Stenius K, Eloranta TO, Hölttä E. Polyamines may regulate S-phase progression but not the dynamic changes of chromatin during the cell cycle. *J Cell Biochem*. 1998 Feb 1;68(2):200–12.
65. Ravanko K, Järvinen K, Paasinen-Sohns A, Hölttä E. Loss of p27Kip1 from cyclin E/cyclin-dependent kinase (CDK) 2 but not from cyclin D1/CDK4 complexes in cells transformed by polyamine biosynthetic enzymes. *Cancer Res*. 2000 Sep 15;60(18):5244–53.
66. Xie X, Tome ME, Gerner EW. Loss of intracellular putrescine pool-size regulation induces apoptosis. *Exp Cell Res*. 1997 Feb 1;230(2):386–92.
67. Pfeiffer LM, Yang CH, Murti A, McCormack SA, Viar MJ, Ray RM, et al. Polyamine depletion induces rapid NF-kappa B activation in IEC-6 cells. *J Biol Chem*. 2001 Dec 7;276(49):45909–13.
68. Mandal S, Mandal A, Park MH. Depletion of the polyamines spermidine and spermine by overexpression of spermidine/spermine N¹-acetyltransferase 1 (SAT1) leads to mitochondria-mediated apoptosis in mammalian cells. *Biochem J*. 2015 Jun 15;468(3):435–47.
69. Kahana C. Regulation of cellular polyamine levels and cellular proliferation by antizyme and antizyme inhibitor. *Essays Biochem*. 2009;46:47–61.
70. Russell D, Snyder SH. Amine synthesis in rapidly growing tissues: ornithine decarboxylase activity in regenerating rat liver, chick embryo, and various tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1968 Aug;60(4):1420–7.
71. Russell DH, Levy CC, Schimpff SC, Hawk IA. Urinary polyamines in cancer patients. *Cancer Res*. 1971 Nov;31(11):1555–8.



72. Megosh L, Gilmour SK, Rosson D, Soler AP, Blessing M, Sawicki JA, et al. Increased frequency of spontaneous skin tumors in transgenic mice which overexpress ornithine decarboxylase. *Cancer Res.* 1995 Oct 1;55(19):4205–9.
73. Guo Y, Cleveland JL, O'Brien TG. Haploinsufficiency for *odc* modifies mouse skin tumor susceptibility. *Cancer Res.* 2005 Feb 15;65(4):1146–9.
74. Weeks CE, Herrmann AL, Nelson FR, Slaga TJ. alpha-Difluoromethylornithine, an irreversible inhibitor of ornithine decarboxylase, inhibits tumor promoter-induced polyamine accumulation and carcinogenesis in mouse skin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982 Oct;79(19):6028–32.
75. Moulinoux JP, Quemener V, Cipolla B, Guillé F, Havouis R, Martin C, et al. The growth of MAT-LyLu rat prostatic adenocarcinoma can be prevented *in vivo* by polyamine deprivation. *J Urol.* 1991 Nov;146(5):1408–12.
76. Holley JL, Mather A, Wheelhouse RT, Cullis PM, Hartley JA, Bingham JP, et al. Targeting of tumor cells and DNA by a chlorambucil-spermidine conjugate. *Cancer Res.* 1992 Aug 1;52(15):4190–5.
77. Delcros J-G, Tomasi S, Carrington S, Martin B, Renault J, Blagbrough IS, et al. Effect of spermine conjugation on the cytotoxicity and cellular transport of acridine. *J Med Chem.* 2002 Nov 7;45(23):5098–111.
78. Phanstiel O, Kaur N, Delcros J-G. Structure-activity investigations of polyamine-anthracene conjugates and their uptake via the polyamine transporter. *Amino Acids.* 2007 Aug;33(2):305–13.
79. Wang C, Delcros J-G, Biggerstaff J, Phanstiel O. Molecular requirements for targeting the polyamine transport system. Synthesis and biological evaluation of polyamine-anthracene conjugates. *J Med Chem.* 2003 Jun 19;46(13):2672–82.
80. Wang C, Delcros J-G, Cannon L, Konate F, Carias H, Biggerstaff J, et al. Defining the molecular requirements for the selective delivery of polyamine conjugates into cells containing active polyamine transporters. *J Med Chem.* 2003 Nov 20;46(24):5129–38.
81. Palmer AJ, Ghani RA, Kaur N, Phanstiel O, Wallace HM. A putrescine-anthracene conjugate: a paradigm for selective drug delivery. *Biochem J.* 2009 Dec 15;424(3):431–8.
82. Traquete R, Ghani RA, Phanstiel O, Wallace HM. Ant 4,4, a polyamine-anthracene conjugate, induces cell death and recovery in human promyelogenous leukemia cells (HL-60). *Amino Acids.* 2013 Apr;44(4):1193–203.
83. Windahl T, Andersson SO, Lofgren L. Photodynamic therapy of localised prostatic cancer. *Lancet Lond Engl.* 1990 Nov 3;336(8723):1139.
84. Zaak D, Sroka R, Höppner M, Khoder W, Reich O, Tritschler S, et al. Photodynamic Therapy by Means of 5-ALA Induced PPIX in Human Prostate Cancer – Preliminary Results. *Med Laser Appl.* 2003 Jan;18(1):91–5.
85. Arumainayagam N, Moore CM, Ahmed HU, Emberton M. Photodynamic therapy for focal ablation of the prostate. *World J Urol.* 2010 Oct;28(5):571–6.



86. Azzouzi A-R, Barret E, Villers A, Muir G, Moore C, Allen C, et al. 1788 results of tookad® soluble vascular targeted photodynamic therapy (vtp) for low risk localized prostate cancer (PCM203). *J Urol*. 2011 Apr;185(4):e718–9.
87. Park HH. Structural features of caspase-activating complexes. *Int J Mol Sci*. 2012;13(4):4807–18.
88. Gupta S. Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int J Oncol*. 2003 Jan;22(1):15–20.
89. Shibue T, Taniguchi T. BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. *Int J Cancer J Int Cancer*. 2006 Nov 1;119(9):2036–43.
90. Antignani A, Youle RJ. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Dec;18(6):685–9.
91. Garrido C, Galluzzi L, Brunet M, Puig PE, Didelot C, Kroemer G. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ*. 2006 Sep;13(9):1423–33.
92. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001 Jan;2(1):67–71.
93. Modjtahedi N, Giordanetto F, Madeo F, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol*. 2006 May;16(5):264–72.
94. Furre IE, Shahzidi S, Luksiene Z, Møller MTN, Borgen E, Morgan J, et al. Targeting PBR by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy induces apoptosis through translocation of apoptosis-inducing factor in human leukemia cells. *Cancer Res*. 2005 Dec 1;65(23):11051–60.
95. Lam M, Oleinick NL, Nieminen AL. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. *J Biol Chem*. 2001 Dec 14;276(50):47379–86.
96. Vantieghem A, Xu Y, Declercq W, Vandenabeele P, Denecker G, Vandenheede JR, et al. Different pathways mediate cytochrome c release after photodynamic therapy with hypericin. *Photochem Photobiol*. 2001 Aug;74(2):133–42.
97. Teiten M-H, Marchal S, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetsnaya L. Primary photodamage sites and mitochondrial events after Foscan photosensitization of MCF-7 human breast cancer cells. *Photochem Photobiol*. 2003 Jul;78(1):9–14.
98. Chiu S-M, Xue L-Y, Usuda J, Azizuddin K, Oleinick NL. Bax is essential for mitochondrion-mediated apoptosis but not for cell death caused by photodynamic therapy. *Br J Cancer*. 2003 Oct 20;89(8):1590–7.
99. He G-F, Bian M-L, Zhao Y-W, Xiang Q, Li H-Y, Xiao C. A study on the mechanism of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy *in vitro* and *in vivo* in cervical cancer. *Oncol Rep*. 2009 Apr;21(4):861–8.
100. Chen X, Zhao P, Chen F, Li L, Luo R. Effect and mechanism of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy in esophageal cancer. *Lasers Med Sci*. 2011 Jan;26(1):69–78.



101. He G, Bian M, Zhao Y, Xiang Q, Li H, Xiao C. [Effects of 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy on cervical cancer: *in vivo* experiment with nude mice]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2008 Mar 4;88(9):635–40.
102. Ferenc P, Solár P, Kleban J, Mikes J, Fedorocko P. Down-regulation of Bcl-2 and Akt induced by combination of photoactivated hypericin and genistein in human breast cancer cells. *J Photochem Photobiol B*. 2010 Jan 21;98(1):25–34.
103. Koval J, Mikes J, Jendzelovský R, Kello M, Solár P, Fedorocko P. Degradation of HER2 receptor through hypericin-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2010 Feb;86(1):200–5.
104. Mikes J, Koval' J, Jendzelovský R, Sacková V, Uhrinová I, Kello M, et al. The role of p53 in the efficiency of photodynamic therapy with hypericin and subsequent long-term survival of colon cancer cells. *Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol*. 2009 Nov;8(11):1558–67.
105. Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. *Oncogene*. 2001 Jun 7;20(26):3420–7.
106. Shen XY, Zacal N, Singh G, Rainbow AJ. Alterations in mitochondrial and apoptosis-regulating gene expression in photodynamic therapy-resistant variants of HT29 colon carcinoma cells. *Photochem Photobiol*. 2005 Apr;81(2):306–13.
107. Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta BBA - Rev Cancer*. 2004 Sep;1704(2):59–86.
108. Grebenová D, Kuzelová K, Smetana K, Pluskalová M, Cajthamlová H, Marinov I, et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. *J Photochem Photobiol B*. 2003 Feb;69(2):71–85.
109. Tian Y, Leung W, Yue K, Mak N. Cell death induced by MPPa-PDT in prostate carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006 Sep 22;348(2):413–20.
110. Fukuhara H, Inoue K, Kurabayashi A, Furihata M, Fujita H, Utsumi K, et al. The inhibition of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based photodynamic action for prostate cancer. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013 Dec;10(4):399–409.
111. He XY, Sikes RA, Thomsen S, Chung LW, Jacques SL. Photodynamic therapy with photofrin II induces programmed cell death in carcinoma cell lines. *Photochem Photobiol*. 1994 Apr;59(4):468–73.
112. Sircar K, Yoshimoto M, Monzon FA, Koumakpayi IH, Katz RL, Khanna A, et al. PTEN genomic deletion is associated with p-Akt and AR signalling in poorer outcome, hormone refractory prostate cancer. *J Pathol*. 2009 Aug;218(4):505–13.
113. Ni J, Cozzi P, Hao J, Beretov J, Chang L, Duan W, et al. Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) is associated with prostate cancer metastasis and chemo/radioresistance via the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*. 2013 Dec;45(12):2736–48.



114. Mulholland DJ, Kobayashi N, Ruscetti M, Zhi A, Tran LM, Huang J, et al. Pten loss and RAS/MAPK activation cooperate to promote EMT and metastasis initiated from prostate cancer stem/progenitor cells. *Cancer Res.* 2012 Apr 1;72(7):1878–89.
115. Bakin RE, Gioeli D, Sikes RA, Bissonette EA, Weber MJ. Constitutive activation of the Ras/mitogen-activated protein kinase signaling pathway promotes androgen hypersensitivity in LNCaP prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2003 Apr 15;63(8):1981–9.
116. Bakin RE, Gioeli D, Bissonette EA, Weber MJ. Attenuation of Ras signaling restores androgen sensitivity to hormone-refractory C4-2 prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2003 Apr 15;63(8):1975–80.
117. Yin J, Pollock C, Tracy K, Chock M, Martin P, Oberst M, et al. Activation of the RalGEF/Ral pathway promotes prostate cancer metastasis to bone. *Mol Cell Biol.* 2007 Nov;27(21):7538–50.
118. Ara T, Declerck YA. Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2010 May;46(7):1223–31.
119. Tong Z, Singh G, Rainbow AJ. Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase pathway protects cells from photofrin-mediated photodynamic therapy. *Cancer Res.* 2002 Oct 1;62(19):5528–35.
120. Tong Z, Singh G, Valerie K, Rainbow AJ. Activation of the stress-activated JNK and p38 MAP kinases in human cells by Photofrin-mediated photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B.* 2003 Oct 15;71(1–3):77–85.
121. Assefa Z, Vantieghem A, Declercq W, Vandenabeele P, Vandenheede JR, Merlevede W, et al. The activation of the c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways protects HeLa cells from apoptosis following photodynamic therapy with hypericin. *J Biol Chem.* 1999 Mar 26;274(13):8788–96.
122. Ge X, Liu J, Shi Z, Jing L, Yu N, Zhang X, et al. Inhibition of MAPK signaling pathways enhances cell death induced by 5-Aminolevulinic acid-photodynamic therapy in skin squamous carcinoma cells. *Eur J Dermatol EJD.* 2016 Apr 1;
123. Coupienne I, Bontems S, Dewaele M, Rubio N, Habraken Y, Fulda S, et al. NF-kappaB inhibition improves the sensitivity of human glioblastoma cells to 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. *Biochem Pharmacol.* 2011 Mar 1;81(5):606–16.
124. Piper P, Vane J. The release of prostaglandins from lung and other tissues. *Ann N Y Acad Sci.* 1971 Apr 30;180:363–85.
125. Knights KM, Mangoni AA, Miners JO. Defining the COX inhibitor selectivity of NSAIDs: implications for understanding toxicity. *Expert Rev Clin Pharmacol.* 2010 Nov;3(6):769–76.
126. Chandrasekharan NV, Simmons DL. The cyclooxygenases. *Genome Biol.* 2004;5(9):241.
127. Sobolewski C, Cerella C, Dicato M, Ghibelli L, Diederich M. The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies. *Int J Cell Biol.* 2010;2010:215158.



128. Salvado MD, Alfranca A, Haeggström JZ, Redondo JM. Prostanoids in tumor angiogenesis: therapeutic intervention beyond COX-2. *Trends Mol Med*. 2012 Apr;18(4):233–43.
129. Hussain T, Gupta S, Mukhtar H. Cyclooxygenase-2 and prostate carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2003 Mar 10;191(2):125–35.
130. Harper KA, Tyson-Capper AJ. Complexity of COX-2 gene regulation. *Biochem Soc Trans*. 2008 Jun;36(Pt 3):543–5.
131. Song SH, Jong HS, Choi HH, Inoue H, Tanabe T, Kim NK, et al. Transcriptional silencing of Cyclooxygenase-2 by hyper-methylation of the 5' CpG island in human gastric carcinoma cells. *Cancer Res*. 2001 Jun 1;61(11):4628–35.
132. Yamaguchi K, Lantowski A, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K. Histone Deacetylase Inhibitors Suppress the Induction of c-Jun and Its Target Genes Including COX-2. *J Biol Chem*. 2005 Sep 23;280(38):32569–77.
133. Fernau NS, Fugmann D, Leyendecker M, Reimann K, Grether-Beck S, Galban S, et al. Role of HuR and p38MAPK in ultraviolet B-induced post-transcriptional regulation of COX-2 expression in the human keratinocyte cell line HaCaT. *J Biol Chem*. 2010 Feb 5;285(6):3896–904.
134. Strillacci A, Griffoni C, Sansone P, Paterini P, Piazzini G, Lazzarini G, et al. MiR-101 downregulation is involved in cyclooxygenase-2 overexpression in human colon cancer cells. *Exp Cell Res*. 2009 May 1;315(8):1439–47.
135. Wang H-J, Ruan H-J, He X-J, Ma Y-Y, Jiang X-T, Xia Y-J, et al. MicroRNA-101 is down-regulated in gastric cancer and involved in cell migration and invasion. *Eur J Cancer Oxf Engl* 1990. 2010 Aug;46(12):2295–303.
136. Hao Y, Gu X, Zhao Y, Greene S, Sha W, Smoot DT, et al. Enforced Expression of miR-101 Inhibits Prostate Cancer Cell Growth by Modulating the COX-2 Pathway *In Vivo*. *Cancer Prev Res (Phila Pa)*. 2011 Jul 1;4(7):1073–83.
137. Ristimäki A, Sivula A, Lundin J, Lundin M, Salminen T, Haglund C, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer Res*. 2002 Feb 1;62(3):632–5.
138. Sinicrope FA, Gill S. Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2004 Jun;23(1–2):63–75.
139. Gupta S, Srivastava M, Ahmad N, Bostwick DG, Mukhtar H. Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma. *The Prostate*. 2000 Jan;42(1):73–8.
140. Uotila P, Valve E, Martikainen P, Nevalainen M, Nurmi M, Härkönen P. Increased expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human prostate cancer. *Urol Res*. 2001 Feb;29(1):23–8.
141. Nikolic D, van Breemen RB. DNA oxidation induced by cyclooxygenase-2. *Chem Res Toxicol*. 2001 Apr;14(4):351–4.
142. Dannenberg AJ, Altorki NK, Boyle JO, Dang C, Howe LR, Weksler BB, et al. Cyclooxygenase 2: a pharmacological target for the prevention of cancer. *Lancet Oncol*. 2001 Sep;2(9):544–51.



143. Wiese FW, Thompson PA, Kadlubar FF. Carcinogen substrate specificity of human COX-1 and COX-2. *Carcinogenesis*. 2001 Jan;22(1):5–10.
144. Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, McIntyre TM, Prescott SM. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Oct 10;97(21):11280–5.
145. Liou J-Y, Ghelani D, Yeh S, Wu KK. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce colorectal cancer cell apoptosis by suppressing 14-3-3epsilon. *Cancer Res*. 2007 Apr 1;67(7):3185–91.
146. Wang D. PROSTAGLANDINS AND CANCER. *Gut*. 2006 Jan 1;55(1):115–22.
147. Liu XH, Yao S, Kirschenbaum A, Levine AC. NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells. *Cancer Res*. 1998 Oct 1;58(19):4245–9.
148. Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, Sawaoka H, Hori M, DuBois RN. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell*. 1998 May 29;93(5):705–16.
149. Chen Y, Hughes-Fulford M. Prostaglandin E2 and the protein kinase A pathway mediate arachidonic acid induction of c-fos in human prostate cancer cells. *Br J Cancer*. 2000 Jun;82(12):2000–6.
150. Wang X, Klein RD. Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor secretion in prostate cancer cells through EP2 receptor-mediated cAMP pathway. *Mol Carcinog*. 2007 Nov;46(11):912–23.
151. Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr 1;94(7):3336–40.
152. Okamoto A, Shirakawa T, Bito T, Shigemura K, Hamada K, Gotoh A, et al. Etodolac, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces upregulation of E-cadherin and has antitumor effect on human bladder cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Urology*. 2008 Jan;71(1):156–60.
153. Ma X, Kundu N, Rifat S, Walser T, Fulton AM. Prostaglandin E receptor EP4 antagonism inhibits breast cancer metastasis. *Cancer Res*. 2006 Mar 15;66(6):2923–7.
154. Palayoor ST, Arayankalayil MJ, Shoaibi A, Coleman CN. Radiation sensitivity of human carcinoma cells transfected with small interfering RNA targeted against cyclooxygenase-2. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2005 Oct 1;11(19 Pt 1):6980–6.
155. Czemberek C, Eder-Czemberek C, Erovic BM, Turhani D, Spittler A, Selzer E, et al. The cyclooxygenase-2 inhibitor nimesulide, a nonsteroidal analgesic, decreases the effect of radiation therapy in head-and-neck cancer cells. *Strahlenther Onkol Organ Dtsch Röntgenges Al*. 2009 May;185(5):310–7.
156. Ferrario A, Fisher AM, Rucker N, Gomer CJ. Celecoxib and NS-398 enhance photodynamic therapy by increasing *in vitro* apoptosis and decreasing *in vivo* inflammatory and angiogenic factors. *Cancer Res*. 2005 Oct 15;65(20):9473–8.
157. Hendrickx N, Volanti C, Moens U, Seternes OM, de Witte P, Vandenheede JR, et al. Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-



- mediated photodynamic therapy of human cancer cells. *J Biol Chem*. 2003 Dec 26;278(52):52231–9.
158. Hsu AL, Ching TT, Wang DS, Song X, Rangnekar VM, Chen CS. The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2. *J Biol Chem*. 2000 Apr 14;275(15):11397–403.
 159. Majeski AE, Dice JF. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*. 2004 Dec;36(12):2435–44.
 160. Klionsky DJ, Codogno P. The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J Innate Immun*. 2013;5(5):427–33.
 161. Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol CB*. 2012 Jan 10;22(1):R29–34.
 162. Jung CH, Jun CB, Ro S-H, Kim Y-M, Otto NM, Cao J, et al. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell*. 2009 Apr;20(7):1992–2003.
 163. Shackelford DB, Shaw RJ. The LKB1-AMPK pathway: metabolism and growth control in tumour suppression. *Nat Rev Cancer*. 2009 Aug;9(8):563–75.
 164. Huang J, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J*. 2008 Jun 1;412(2):179–90.
 165. Maiuri MC, Tasdemir E, Criollo A, Morselli E, Vicencio JM, Carnuccio R, et al. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ*. 2009 Jan;16(1):87–93.
 166. Tasdemir E, Chiara Maiuri M, Morselli E, Criollo A, D'Amelio M, Djavaheri-Mergny M, et al. A dual role of p53 in the control of autophagy. *Autophagy*. 2008 Aug;4(6):810–4.
 167. Amin A, Bajbouj K, Koch A, Gandesiri M, Schneider-Stock R. Defective autophagosome formation in p53-null colorectal cancer reinforces crocin-induced apoptosis. *Int J Mol Sci*. 2015;16(1):1544–61.
 168. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 2008 Jan 11;132(1):27–42.
 169. Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Autophagy, organelles and ageing. *J Pathol*. 2007 Jan;211(2):134–43.
 170. Liang C, Jung JU. Autophagy genes as tumor suppressors. *Curr Opin Cell Biol*. 2010 Apr;22(2):226–33.
 171. Kisen GO, Tessitore L, Costelli P, Gordon PB, Schwarze PE, Baccino FM, et al. Reduced autophagic activity in primary rat hepatocellular carcinoma and ascites hepatoma cells. *Carcinogenesis*. 1993 Dec;14(12):2501–5.
 172. Luo J, Manning BD, Cantley LC. Targeting the PI3K-Akt pathway in human cancer: rationale and promise. *Cancer Cell*. 2003 Oct;4(4):257–62.
 173. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science*. 1997 Mar 28;275(5308):1943–7.



174. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature*. 1999 Dec 9;402(6762):672–6.
175. Mathew R, White E. Why sick cells produce tumors: the protective role of autophagy. *Autophagy*. 2007 Oct;3(5):502–5.
176. Mortensen M, Soilleux EJ, Djordjevic G, Tripp R, Lutteropp M, Sadighi-Akha E, et al. The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J Exp Med*. 2011 Mar 14;208(3):455–67.
177. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007 Dec;7(12):961–7.
178. Bhutia SK, Dash R, Das SK, Azab B, Su Z-Z, Lee S-G, et al. Mechanism of autophagy to apoptosis switch triggered in prostate cancer cells by antitumor cytokine melanoma differentiation-associated gene 7/interleukin-24. *Cancer Res*. 2010 May 1;70(9):3667–76.
179. Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Takeuchi T, Kuwano H. Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells. *Ann Surg Oncol*. 2009 Mar;16(3):761–71.
180. Han J, Hou W, Goldstein LA, Lu C, Stolz DB, Yin X-M, et al. Involvement of protective autophagy in TRAIL resistance of apoptosis-defective tumor cells. *J Biol Chem*. 2008 Jul 11;283(28):19665–77.
181. Hirschmann-Jax C, Foster AE, Wulf GG, Nuchtern JG, Jax TW, Gobel U, et al. A distinct “side population” of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 28;101(39):14228–33.
182. Fu J, Liu Z, Liu X, Chen F, Shi H, Pangjessie C, et al. Glioblastoma stem cells resistant to temozolomide-induced autophagy. *Chin Med J (Engl)*. 2009 Jun 5;122(11):1255–9.
183. Lomonaco SL, Finniss S, Xiang C, Decarvalho A, Umansky F, Kalkanis SN, et al. The induction of autophagy by gamma-radiation contributes to the radioresistance of glioma stem cells. *Int J Cancer*. 2009 Aug 1;125(3):717–22.
184. Xu DD, Lam HM, Hoeven R, Xu CB, Leung AWN, Cho WCS. Photodynamic therapy induced cell death of hormone insensitive prostate cancer PC-3 cells with autophagic characteristics. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2013 Sep;10(3):278–87.
185. Reiners JJ, Agostinis P, Berg K, Oleinick NL, Kessel D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. *Autophagy*. 2010 Jan;6(1):7–18.
186. Lihuan D, Jingcun Z, Ning J, Guozeng W, Yiwei C, Wei L, et al. Photodynamic therapy with the novel photosensitizer chlorophyllin f induces apoptosis and autophagy in human bladder cancer cells. *Lasers Surg Med*. 2014 Apr;46(4):319–34.
187. Tu P, Huang Q, Ou Y, Du X, Li K, Tao Y, et al. Aloe-emodin-mediated photodynamic therapy induces autophagy and apoptosis in human osteosarcoma cell line MG-63 through the ROS/JNK signaling pathway. *Oncol Rep*. 2016 Jun;35(6):3209–15.
188. Xue Q, Wang X, Wang P, Zhang K, Liu Q. Role of p38MAPK in apoptosis and autophagy responses to photodynamic therapy with Chlorin e6. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2015 Mar;12(1):84–91.



189. Wei M-F, Chen M-W, Chen K-C, Lou P-J, Lin SY-F, Hung S-C, et al. Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. *Autophagy*. 2014 Jul;10(7):1179–92.
190. Panzarini E, Inguscio V, Dini L. Timing the multiple cell death pathways initiated by Rose Bengal acetate photodynamic therapy. *Cell Death Dis*. 2011;2:e169.
191. Kessel D. Subcellular targets for photodynamic therapy: implications for initiation of apoptosis and autophagy. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN*. 2012 Oct 1;10 Suppl 2:S56-59.
192. Mandel JL, Flintoff WF. Isolation of mutant mammalian cells altered in polyamine transport. *J Cell Physiol*. 1978 Dec;97(3 Pt 1):335–43.
193. Bello D, Webber MM, Kleinman HK, Wartinger DD, Rhim JS. Androgen responsive adult human prostatic epithelial cell lines immortalized by human papillomavirus 18. *Carcinogenesis*. 1997 Jun;18(6):1215–23.
194. Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW. Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol*. 1979 Jul;17(1):16–23.
195. Stone KR, Mickey DD, Wunderli H, Mickey GH, Paulson DF. Isolation of a human prostate carcinoma cell line (DU 145). *Int J Cancer*. 1978 Mar 15;21(3):274–81.
196. Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, et al. LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res*. 1983 Apr;43(4):1809–18.
197. Sarrazy V, Garcia G, MBakidi JP, Morvan CL, Bégaud-Grimaud G, Granet R, et al. Photodynamic effects of porphyrin-polyamine conjugates in human breast cancer and keratinocyte cell lines. *J Photochem Photobiol B*. 2011 Jun 2;103(3):201–6.
198. Sol V, Lamarche F, Enache M, Garcia G, Granet R, Guilloton M, et al. Polyamine conjugates of meso-tritylporphyrin and protoporphyrin IX: potential agents for photodynamic therapy of cancers. *Bioorg Med Chem*. 2006 Mar 1;14(5):1364–77.
199. Garcia G, Sarrazy V, Sol V, Le Morvan C, Granet R, Alves S, et al. DNA photocleavage by porphyrin-polyamine conjugates. *Bioorg Med Chem*. 2009 Jan 15;17(2):767–76.
200. Liu J, Zheng L, Li Y, Zhang Z, Zhang L, Shen L, et al. Effect of DTPP-mediated photodynamic therapy on cell morphology, viability, cell cycle, and cytotoxicity in a murine lung adenocarcinoma cell line. *Lasers Med Sci*. 2015 Jan;30(1):181–91.
201. He G-F, Bian M-L, Zhao Y-W, Xiang Q, Li H-Y, Xiao C. [Apoptosis-inducing effect of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy (5-ALA-PDT) on cervical cancer cell lines]. *Ai Zheng Aizheng Chin J Cancer*. 2008 Sep;27(9):897–904.
202. Bhowmick R, Girotti AW. Pro-survival and pro-growth effects of stress-induced nitric oxide in a prostate cancer photodynamic therapy model. *Cancer Lett*. 2014 Feb 1;343(1):115–22.
203. Postiglione I, Barra F, Aloj SM, Palumbo G. Photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid and DNA damage: unravelling roles of p53 and ABCG2. *Cell Prolif*. 2016 Aug;49(4):523–38.



204. Cunningham D, You Z. *In vitro* and *in vivo* model systems used in prostate cancer research. *J Biol Methods*. 2015 Jun 4;2(1):17.
205. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif*. 2003 Jun;36(3):131–49.
206. Tong Z, Singh G, Rainbow AJ. The role of the p53 tumor suppressor in the response of human cells to photofrin-mediated photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*. 2000 Feb;71(2):201–10.
207. Ahn S-G. Pheophorbide α -mediated photodynamic therapy induces apoptotic cell death in murine oral squamous cell carcinoma *in vitro* and *in vivo*. *Oncol Rep* [Internet]. 2012 Mar 27 [cited 2016 Sep 11]; Available from: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2012.1748>
208. Kriska T, Korytowski W, Girotti AW. Hyperresistance to photosensitized lipid peroxidation and apoptotic killing in 5-aminolevulinic acid-treated tumor cells overexpressing mitochondrial GPX4. *Free Radic Biol Med*. 2002 Nov 15;33(10):1389–402.
209. Zawacka-Pankau J, Issaeva N, Hossain S, Pramanik A, Selivanova G, Podhajski AJ. Protoporphyrin IX interacts with wild-type p53 protein *in vitro* and induces cell death of human colon cancer cells in a p53-dependent and -independent manner. *J Biol Chem*. 2007 Jan 26;282(4):2466–72.
210. Hussain T, Gupta S, Mukhtar H. Cyclooxygenase-2 and prostate carcinogenesis. *Cancer Lett*. 2003 Mar 10;191(2):125–35.
211. Song J, Wei Y, Chen Q, Xing D. Cyclooxygenase 2-mediated apoptotic and inflammatory responses in photodynamic therapy treated breast adenocarcinoma cells and xenografts. *J Photochem Photobiol B*. 2014 May 5;134:27–36.
212. Dewaele M, Martinet W, Rubio N, Verfaillie T, de Witte PA, Piette J, et al. Autophagy pathways activated in response to PDT contribute to cell resistance against ROS damage. *J Cell Mol Med*. 2011 Jun;15(6):1402–14.
213. Xue Q, Wang P, Wang X, Zhang K, Liu Q. Targeted inhibition of p38MAPK-enhanced autophagy in SW620 cells resistant to photodynamic therapy-induced apoptosis. *Lasers Med Sci*. 2015 Sep;30(7):1967–75.
214. Ziółkowska B, Woźniak M, Ziółkowski P. Co-expression of autophagic markers following photodynamic therapy in SW620 human colon adenocarcinoma cells. *Mol Med Rep*. 2016 Sep;14(3):2548–54.
215. Cecconi F, Levine B. The Role of Autophagy in Mammalian Development: Cell Makeover Rather than Cell Death. *Dev Cell*. 2008 Sep;15(3):344–57.
216. Xue L-Y, Chiu S-M, Oleinick NL. Atg7 deficiency increases resistance of MCF-7 human breast cancer cells to photodynamic therapy. *Autophagy*. 2010 Feb;6(2):248–55.
217. Xiao Z, Halls S, Dickey D, Tulip J, Moore RB. Fractionated versus standard continuous light delivery in interstitial photodynamic therapy of dunning prostate carcinomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2007 Dec 15;13(24):7496–505.



218. Lawson DA, Zong Y, Memarzadeh S, Xin L, Huang J, Witte ON. Basal epithelial stem cells are efficient targets for prostate cancer initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 9;107(6):2610–5.
219. Reiter RE, Gu Z, Watabe T, Thomas G, Szigeti K, Davis E, et al. Prostate stem cell antigen: a cell surface marker overexpressed in prostate cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Feb 17;95(4):1735–40.
220. Wang X, Kruihof-de Julio M, Economides KD, Walker D, Yu H, Halli MV, et al. A luminal epithelial stem cell that is a cell of origin for prostate cancer. *Nature*. 2009 Sep 24;461(7263):495–500.
221. Salm SN, Burger PE, Coetzee S, Goto K, Moscatelli D, Wilson EL. TGF- β maintains dormancy of prostatic stem cells in the proximal region of ducts. *J Cell Biol*. 2005 Jul 4;170(1):81–90.
222. Frame FM, Savoie H, Bryden F, Giuntini F, Mann VM, Simms MS, et al. Mechanisms of growth inhibition of primary prostate epithelial cells following gamma irradiation or photodynamic therapy include senescence, necrosis, and autophagy, but not apoptosis. *Cancer Med*. 2016 Jan;5(1):61–73.
223. Di Venosa G, Vallecorsa P, Giuntini F, Mamone L, Batlle A, Vanzuli S, et al. The use of dipeptide derivatives of 5-aminolaevulinic acid promotes their entry to tumor cells and improves tumor selectivity of photodynamic therapy. *Mol Cancer Ther*. 2015 Feb;14(2):440–51.
224. Webber J, Luo Y, Crilly R, Fromm D, Kessel D. An apoptotic response to photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin *in vivo*. *J Photochem Photobiol B*. 1996 Sep;35(3):209–11.
225. Yamamoto J, Yamamoto S, Hirano T, Li S, Koide M, Kohno E, et al. Monitoring of singlet oxygen is useful for predicting the photodynamic effects in the treatment for experimental glioma. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2006 Dec 1;12(23):7132–9.
226. Pollard M, Luckert PH, Snyder DL. The promotional effect of testosterone on induction of prostate-cancer in MNU-sensitized L-W rats. *Cancer Lett*. 1989 Jun;45(3):209–12.
227. Geldof AA, Rao BR. Prostatic tumor (R3327) skeletal metastasis. *The Prostate*. 1990;16(4):279–90.



TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figure I- 1 - Localisation de la prostate.....	23
Figure I- 2 - Structures cellulaires de la prostate.....	24
Figure I- 3 - Les différentes zones de la prostate.....	25
Figure I- 4 - Nombre de nouveaux cas et de décès en 2011 en France métropolitaine par classe d'âge.	27
Figure I- 5 - Taux d'incidence du cancer de la prostate estimés dans le monde en 2012.	28
Figure I- 6 - Biosynthèse de l'Antigène Spécifique de la Prostate (PSA) dans l'épithélium prostatique sain en comparaison à l'épithélium prostatique cancéreux.....	32
Figure I- 7 – Représentation schématique des principaux domaines fonctionnels du récepteur des androgènes.....	34
Figure I- 8 - Voie génomique classique de l'activation des récepteurs AR.	35
Figure I- 9 - Les récepteurs aux androgènes et cycle cellulaire.	36
Figure I- 10 - Changements de l'activité des récepteurs AR dus à des modifications génomiques.....	38
Figure I- 11- La prostatectomie radicale	40
Figure I- 12- La radiothérapie et cancer de la prostate.	41
Figure I- 13- L'hormonothérapie et cancer de la prostate.	42
Figure I- 14- Représentation des options de traitement en thérapie focale prostatique.....	43
Figure I- 15- La cryothérapie et cancer de la prostate.....	44
Figure I- 16- HIFU et cancer de la prostate.....	45
Figure I- 17- Propagation de la lumière au sein des tissus.	46
Figure I- 18- Principe de la photothérapie dynamique (PDT).	47
Figure I- 19- Principe des 2 composantes de la PDT : la photothérapie et le photodiagnostic.	48
Figure I- 20- Principe général de la PDT.....	49
Figure I- 21- Diagramme de Jablonski.....	50
Figure I- 22- Les réactions photochimiques de type I.....	51
Figure I- 23– Relation entre la durée de vie, la réactivité et la distance de diffusion des ROS.	51
Figure I- 24- Classification des photosensibilisateurs.	53
Figure I- 25- Structure de l'hypéricine.....	53
Figure I- 26- Structure de la méso-tétra hydroxyphénylchlorine (mTPHC) ou Foscan®.....	55



Figure I- 27 - Structure de la mono-l-aspartyl chlorine 6 ou NPe6.	56
Figure I- 28- Structure de la texaphyrine de lutétium ou Lutex®	57
Figure I- 29- Structure du TOOKAD®.	57
Figure I- 30- Mécanisme d'action du Tookad®.	58
Figure I- 31- Structure d'une phtalocyanine.	58
Figure I- 32- Structure de l'acide 5-aminolévulinique et de la protoporphyrine IX.....	59
Figure I- 33- Biosynthèse de l'hème.	59
Figure I- 34- Spectre d'absorption de la Protoporphyrine IX.	60
Figure I- 35- Structure des porphyrines synthétisées à partir de sang.	63
Figure I- 36- Exemple de méso-porphyrines glycosylées phototoxiques préparées au LCSN	63
Figure I- 37- Porphyrine triglucosylée portant un résidu alanine	64
Figure I- 38- Structures et charges électriques des 3 principales polyamines.....	64
Figure I- 39- Voie de biosynthèse et de rétro-conversion des polyamines.	66
Figure I- 40- Modèles théoriques du système de transport des polyamines (PTS).	69
Figure I- 41- Structure de la protoporphyrine IX dispermidinée (PpIX-dSd).	71
Figure I- 42- Structure de la protoporphyrine IX disperminée (PpIX-dSm).	72
Figure I- 43- Homologie de structure des caspases chez l'Homme.	77
Figure I- 44- Activation des caspases.....	78
Figure I- 45- Voie apoptotique extrinsèque ou voie des récepteurs de mort.	80
Figure I- 46- La mitochondrie, organe producteur d'énergie.....	81
Figure I- 47- Origine de la perturbation des membranes mitochondriales au cours de l'apoptose.....	83
Figure I- 48- Voie apoptotique intrinsèque ou voie mitochondriale.....	85
Figure I- 49- Cascades d'activation des MAPKs.	90
Figure I- 50- Activation de la voie PI3K/Akt.....	91
Figure I- 51- Activation de la voie NF-κB.....	92
Figure I- 52- Structure de l'acide salicylique (A) et de l'acide acétylsalicylique ou Aspirine® (B)	96
Figure I- 53 - Homologie de structure entre COX-1 et COX-2.....	97
Figure I- 54 - Voie de libération de l'acide arachidonique des phospholipides membranaires.	98
Figure I- 55 - Cascades de biosynthèse des prostanoides.	100
Figure I- 56 - Régulation de la cyclooxygénase-2.	103



Figure I- 57 – Implication de la cyclooxygénase-2 dans la cancérogenèse prostatique. D'après Hussain et al. 2003, (129).	104
Figure I- 58 – L'initiation du processus de l'autophagie.	110
Figure I- 59 – Système d'ubiquitination d'une protéine.	110
Figure I- 60 – Formation du complexe de conjugaison Atg12-Atg5.....	111
Figure I- 61 - Formation du complexe de conjugaison LC3-II.....	112
Figure I- 62 - La formation de l'autophagosome.	112
Figure I- 63 – Les régulateurs principaux de mTOR, l'inhibiteur principal de l'autophagie. .	115
Figure R- 1– Effets des photosensibilisateurs sur la viabilité des lignées cellulaires CHO et CHO-MG.	136
Figure R- 2– Effets du Photofrin et du 5-ALA photoactivés par la lumière rouge sur la viabilité des lignées cellulaires PC-3, DU 145 et LNCaP.	137
Figure R- 3 – Effets de la protoporphyrine IX seule et polyaminée sur des lignées prostatiques humaines	139
Figure R- 4 – Accumulation de la PpIX dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines en cas de vectorisation ou non par les polyamines.....	141
Figure R- 5 – Absence de colocalisation des PS avec la mitochondrie ou les lysosomes dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines	142
Figure R- 6 – Exemple de représentation de la répartition des cellules dans le cycle cellulaire	143
Figure R- 7 – Effets de la protoporphyrine IX polyaminée sur le cycle cellulaire de la lignée cancéreuse prostatique humaine PC-3.....	144
Figure R- 8 - Effets de la protoporphyrine IX polyaminée sur le cycle cellulaire de la lignée cancéreuse prostatique humaine DU 145.....	145
Figure R- 9 - Effets de la protoporphyrine IX polyaminée sur le cycle cellulaire de la lignée cancéreuse prostatique humaine LNCaP.	146
Figure R- 10 – Effets des photosensibilisateurs sur l'expression des acteurs clés du cycle cellulaire dans les cellules PC-3.	147
Figure R- 11 – Effets des photosensibilisateurs sur l'expression des acteurs clés du cycle cellulaire dans les cellules DU 145.	147
Figure R- 12 – Effets des photosensibilisateurs sur l'expression des régulateurs du cycle cellulaire dans les cellules PC-3.	148
Figure R- 13 – Effets des photosensibilisateurs sur l'expression des régulateurs du cycle cellulaire dans les cellules DU 145.	149
Figure R- 14 – Effets des photosensibilisateurs sur l'expression des régulateurs du cycle cellulaire dans les cellules LNCaP.....	150



Figure R- 15 – Effets des photosensibilisateurs sur la production d'espèces oxygénées réactives (ROS) dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3, DU 145 et LNCaP.	151
Figure R- 16 – Effets des photosensibilisateurs sur le potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.....	153
Figure R- 17 – Effets des photosensibilisateurs sur le potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145.....	153
Figure R- 18 – Effets des photosensibilisateurs sur le potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP.	154
Figure R- 19 – Effets des photosensibilisateurs sur l'activation de la caspase-9 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.....	155
Figure R- 20 – Effets des photosensibilisateurs sur l'activation de la caspase-9 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145.....	155
Figure R- 21 – Effets des photosensibilisateurs sur l'activation de la caspase-9 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP.	156
Figure R- 22 – Effets des photosensibilisateurs sur l'activation de la caspase-3 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3, DU 145 LNCaP.	157
Figure R- 23 – Effets des photosensibilisateurs sur le clivage de PARP-1 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.	157
Figure R- 24 – Effets des photosensibilisateurs sur le clivage de PARP-1 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145.	158
Figure R- 25 – Effets des photosensibilisateurs sur le clivage de PARP-1 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP.	158
Figure R- 26 – Effets des photosensibilisateurs sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.....	159
Figure R- 27 – Effets des photosensibilisateurs sur la fragmentatio de l'ADN dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145.	160
Figure R- 28 – Effets des photosensibilisateurs sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP.	161
Figure R- 29 – Effets des photosensibilisateurs sur la fragmentation de l'ADN dans les cellules prostatiques humaines saines RWPE-1.....	162
Figure R- 30 – Effets des photosensibilisateurs sur l'activation de la voie p38/MAPK dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.....	163
Figure R- 31 – Effets des photosensibilisateurs sur l'activation de la voie Akt dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.....	164
Figure R- 32 – Effets des photosensibilisateurs sur l'activation du facteur de survie NF-κB dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.....	165
Figure R- 33 – Effets des photosensibilisateurs sur l'expression de COX-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.	166



Figure R- 34 – Effets des photosensibilisateurs sur l’activité de COX-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.	167
Figure R- 35 – Effets du NS-398 sur l’activité de COX-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.	168
Figure R- 36 – Effets du NS-398 sur la fragmentation de l’ADN dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.	169
Figure R- 37 – Effets de la transfection de shRNA COX-2 sur l’expression de COX-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.	170
Figure R- 38 – Effets de la transfection de shRNA COX-2 sur le taux de fragmentation de l’ADN dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.....	171
Figure R- 39 – Effets de la transfection d’ADN complémentaire COX-2 sur l’expression de COX-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145.....	172
Figure R- 40 – Effets de la diosgénine sur l’expression de COX-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145 transfectées (COX-2 +)	173
Figure R- 41 – Effets de la transfection d’ADNc COX-2 sur le taux de fragmentation de l’ADN dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145.....	174
Figure R- 42 – Effets du SB203580 sur l’expression et l’activité de COX-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.	175
Figure R- 43 – Effets du SB203580 sur la fragmentation de l’ADN dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.	176
Figure R- 44 – Effets des photosensibilisateurs sur l’expression des acteurs autophagiques dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.....	178
Figure R- 45 – Effets de la protoporphyrine IX dispermidinée sur l’activation de mTOR dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.	179
Figure R- 46 – Effets de la protoporphyrine IX dispermidinée sur l’activation des régulateurs de mTOR dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3.	180
Figure R- 47 – Effets de la protoporphyrine IX dispermidinée sur l’activation de mTOR et l’expression des acteurs autophagiques dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145.....	181
Figure R- 48 – Effets de la protoporphyrine IX dispermidinée sur l’activation de mTOR et l’expression des acteurs autophagiques dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines LNCaP.	182
Figure R- 49 – Effets de la protoporphyrine IX polyaminée sur l’expression de Bcl-2	183
Figure R- 50 – Effets des photosensibilisateurs sur la croissance tumorale de cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3 xénotransplantées sur des souris nues.....	185
Figure R- 51 – Effets des photosensibilisateurs sur la croissance tumorale de cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3 xénotransplantées sur des souris nues.....	186
Figure R- 52 – Effets des photosensibilisateurs sur la structure des cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3 xénotransplantées sur des souris nues.	187



Figure R- 53 – Effets des photosensibilisateurs sur la prolifération des cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3 xénotransplantées sur des souris nues.	188
Figure R- 54 – Effets des photosensibilisateurs sur l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3 xénotransplantées sur des souris nues.	189
Figure bilan – Effets de la protoporphyrine IX polyaminée dans les cellules cancéreuses prostatiques humaines.....	211



TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 - La classification TNM – La lettre T.....	29
Tableau 2 - La classification TNM – la lettre M.	30
Tableau 3 – Les stades de cancer de la prostate selon la classification TNM.....	31
Tableau 4 - La stadification multicritères de L’American Joint Committee on Cancer (AJCC)33	
Tableau 5 - Recommandations thérapeutiques prévues suivant le stade multicritère de la tumeur prostatique.	39
Tableau 6 – Caractéristiques principales des photosensibilisateurs les plus utilisés.....	61
Tableau 7 – Principales études cliniques concernant la PDT du cancer de la prostate.....	74



TABLE DES MATIERES

Remerciements	3
Droits d'auteurs	8
Sommaire.....	9
Liste des abréviations.....	11
Introduction	19
Partie bibliographique.....	22
Chapitre I. Le cancer de la prostate	23
I.1. La prostate	23
I.1.1. Localisation et fonctions de la prostate	23
I.1.2. Structures de la prostate	24
I.1.3. Pathologies de la prostate.....	25
La prostatite	26
L'hypertrophie bénigne de la prostate.....	26
Le cancer de la prostate	26
I.2. Le cancer de la prostate	26
I.2.1. L'épidémiologie du cancer de la prostate	26
I.2.2. Les facteurs de risque.....	27
I.2.2.1. Les facteurs de risque établis	27
I.2.2.2. Les facteurs de risque et les facteurs protecteurs probables	28
I.2.3. L'anatomopathologie.....	28
I.2.3.1. La classification TNM	29
I.2.3.2. Le score de Gleason	31
I.2.3.3. Le PSA (Prostate Specific Antigen) : un marqueur anatomopathologique spécifique du cancer de la prostate	31
I.2.3.4. Stadification multicritères AJCC (TNM, Score de Gleason et PSA).....	33
I.3. La transformation de l'androgéno-dépendance à l'androgéno-indépendance	34
I.3.1. Les récepteurs aux androgènes (AR).....	34
I.3.2. Les effets de la privation androgénique.....	36
I.3.3. Les mécanismes cellulaires et moléculaires à l'origine de l'androgéno- indépendance	37
I.3.3.1. Les mécanismes cellulaires	37
I.3.3.2. Les mécanismes moléculaires.....	37
I.4. Les traitements.....	39
I.4.1. La surveillance	39
I.4.2. La prostatectomie radicale	40
I.4.3. La radiothérapie	40
I.4.4. L'hormonothérapie	41
I.4.5. La chimiothérapie.....	42
I.4.6. La thérapie focale	43
I.4.6.1. La cryothérapie.....	43
I.4.6.2. Les ultrasons de haute intensité (HIFU).....	44



I.4.6.3. Radiofréquence interstitielle (RITA)	45
I.4.6.4. L'électroporation irréversible (EI)	45
I.4.6.5. La thérapie laser pour le traitement focal	46
Chapitre II. La photothérapie dynamique (PDT)	48
II.1. Les mécanismes de la photothérapie dynamique	48
II.2. Les réactions photochimiques	49
II.2.1. Les réactions photochimiques de type I	50
II.2.2. Les réactions photochimiques de type II	51
II.3. Le photo-blanchiment des PS.....	52
II.4. Les photosensibilisateurs	52
II.4.1. Les PS non porphyriniques	53
II.4.2. Les PS dérivés de porphyrines	54
II.4.2.1. Les PS de première génération	54
II.4.2.2. Les PS de deuxième génération.....	55
II.4.2.2.1. Le Foscan®	55
II.4.2.2.2. La NPe6 :	56
II.4.2.2.3. Le Lutex®	57
II.4.2.2.4. Le Tookad®	57
II.4.2.2.5. Les cyanines	58
II.4.2.2.6. Le Levulan®.....	59
II.4.2.3. Les PS de troisième génération.....	62
II.4.2.3.1. Nouveaux PS synthétisés au sein du LCSN.....	62
II.4.2.3.2. Les PS glycoconjugués.....	63
II.4.2.3.3. Les PS à motifs RGD	63
II.4.2.3.4. Les PS à motifs polyaminés	64
II.5. Intérêt des polyamines dans le ciblage des cellules tumorales	64
II.5.1.1. Structure et rôle des polyamines	64
II.5.1.1.1. Liaison à l'ADN	65
II.5.1.1.2. Cycle cellulaire	65
II.5.1.1.3. Apoptose.....	65
II.5.2. Sources et métabolisme des polyamines	66
II.5.2.1. Sources endogènes des polyamines et voie de biosynthèse	66
II.5.2.2. Sources exogènes des polyamines	67
II.5.2.2.1. Les polyamines provenant de l'alimentation	67
II.5.2.2.2. Les polyamines relarguées par la flore intestinale	67
II.5.2.2.3. Le système de transport des polyamines	67
II.5.2.3. Polyamines et cancer	69
II.5.2.3.1. Les polyamines, rôle clé en cancérologie	69
II.5.2.3.2. Les polyamines, outils de vectorisation	70
II.5.2.3.3. Les polyamines, vecteurs de PS en PDT	71
II.6. Photothérapie dynamique en cancérologie prostatique	72
Chapitre III. La mort cellulaire programmée ou apoptose	75
III.1. Les rôles physiologiques de l'apoptose	75
III.2. Les voies d'induction de l'apoptose	76
III.2.1. Les acteurs clés de l'apoptose : les caspases.....	76
III.2.1.1. Structure des caspases	76
III.2.1.2. Activation des caspases	77
III.2.1.3. La régulation des caspases	78



III.2.2. La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque	79
III.2.3. La voie apoptotique mitochondriale ou intrinsèque.....	80
III.2.3.1. La mitochondrie, acteur clé de la voie apoptotique intrinsèque	80
III.2.3.2. Les protéines de la famille Bcl-2	81
III.2.3.3. Perméabilisation des membranes mitochondriales	82
III.2.3.4. La voie apoptotique dépendante des caspases	84
III.2.3.5. La voie apoptotique indépendante des caspases	84
III.3. Mort cellulaire programmée et photothérapie dynamique anticancéreuse	86
Chapitre IV. La transduction du signal	88
IV.1. La voie des MAPKS	88
IV.1.1. La voie de ERK.....	88
IV.1.2. La voie de JNK	89
IV.1.3. La voie de p38.....	89
IV.1.4. La voie PI3K/Akt.....	91
IV.2. La voie de NF-κB	92
IV.3. Voies de Transduction du signal et cancer de la prostate	93
IV.4. Voies de transduction du signal et thérapie photodynamique	94
Chapitre V. La cyclooxygénase-2 et son inhibition	96
V.1. Les cyclooxygénases	96
V.1.1. La structure des COXs	96
V.1.1.1. Le domaine N-terminal EGF-like	96
V.1.1.2. Le domaine de liaison à la membrane.....	96
V.1.1.3. Le domaine C-terminal catalytique	97
V.1.2. Les différents isoformes des COXs.....	97
V.1.3. La fonction principale des COXs : la formation de prostanoides	98
V.1.3.1. L'acide arachidonique et la phospholipase A ₂	98
V.1.3.2. Métabolisme de l'AA par la voie des COXs	99
V.2. La régulation de la cyclooxygénase-2	101
V.2.1. La régulation transcriptionnelle de COX-2	101
V.2.2. La régulation post-transcriptionnelle de COX-2.....	101
V.2.3. La régulation post-traductionnelle de COX-2	102
V.3. La prostaglandine E ₂ , métabolite principal de la voie des COXs	103
V.4. Implication de la voie COX-2 dans le cancer de la prostate.....	104
V.4.1. Initiation et promotion de la tumeur	104
V.4.2. Résistance à l'apoptose.....	105
V.4.3. Angiogenèse.....	105
V.4.4. Invasion des tissus et métastases	106
V.5. L'inhibition de COX-2 comme nouvelle stratégie anticancéreuse	106
Chapitre VI. L'autophagie	108
VI.1. Les différentes formes d'autophagie	108
VI.1.1. La micro-autophagie	108
VI.1.2. L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes.....	108
VI.1.3. L'ADN/ARN autophagie	108
VI.1.4. La macro-autophagie.....	109
VI.2. Les étapes de la macro-autophagie	109
VI.2.1. L'initiation	109
VI.2.2. L'élongation	110
VI.2.2.1. Le complexe d'élongation Atg12-Atg5	111



VI.2.2.2. Le complexe d'élongation LC3-PE	111
VI.2.3. La fusion de l'autophagosome avec le lysosome	112
VI.3. Les voies de régulation de l'autophagie	113
VI.3.1. La voie mTOR	113
VI.3.1.1. Le système LKB1/AMPK	114
VI.3.1.2. La voie PI3K/Akt.....	114
VI.3.1.3. Le complexe Bécline-1/Bcl-2.....	114
VI.3.1.4. Le suppresseur de tumeur p53.....	115
VI.4. L'implication de l'autophagie dans la cancérogenèse.....	116
VI.5. Le paradoxe autophagie/cancer	116
VI.5.1. L'autophagie, un suppresseur oncogénique	116
VI.5.2. L'autophagie, un acteur pro-tumoral	117
VI.6. Autophagie et photothérapie dynamique	118
Projet de recherche	120
Matériels et Méthodes	121
Chapitre I. Expérimentations <i>in vitro</i>	122
I.1. Lignées cellulaires et culture	122
I.2. Obtention de lignées transfectées stables	122
I.3. Traitement et irradiation.....	123
I.4. Etude de la viabilité cellulaire	123
I.5. Analyse du cycle cellulaire.....	124
I.6. Localisation des photosensibilisateurs.....	124
I.7. Dosage du taux d'espèces oxygénées réactives	124
I.8. Etude du potentiel membranaire mitochondrial.....	125
I.9. Analyse de l'expression de protéines	125
I.9.1. Extraction des protéines.....	125
I.9.1.1. Extraction des protéines totales.....	125
I.9.1.2. Extraction des protéines cytosoliques et membranaires	125
I.9.2. Expression des protéines	126
I.10. Analyse de l'activation de la caspase-3	128
I.11. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN	128
I.12. Analyse de l'activation des MAP Kinases	129
I.13. Analyse de retard sur gel.....	129
I.14. Dosage du taux de prostaglandine E ₂	130
I.15. Statistiques.....	131
Chapitre II. Expérimentations <i>in vivo</i>	132
II.1. Xénogreffes de cellules cancéreuses prostatiques humaines, traitement et irradiation	132
II.2. Etude de la croissance tumorale.....	132
II.3. Inclusion des tumeurs en paraffine	132
II.4. Colorations et marquages immuno-histologiques des coupes tumorales.....	133
Partie Expérimentale	134
Chapitre I. Expérimentations <i>in vitro</i>	135
I.1. Protoporphyrine IX polyaminée et viabilité cellulaire	135
I.1.1. Effets de la PpIX seule et polyaminée sur la viabilité cellulaire de lignées cellulaires ovariennes de hamster CHO et CHO-MG	136



I.1.2. Effets du photofrin et du 5-ALA sur la viabilité cellulaire de lignées cancéreuses prostatiques humaines.....	137
I.1.3. Effets de la PpIX seule et polyaminée sur la viabilité cellulaire de lignées cellulaires prostatiques humaines.....	138
I.2. Protoporphyrine IX polyaminée et localisation intracellulaire.....	140
I.3. Protoporphyrine IX polyaminée et cycle cellulaire.....	143
I.4. Protoporphyrine IX polyaminée et mort cellulaire programmée.....	151
I.4.1. Production d'espèces oxygénées réactives.....	151
I.4.2. Chute du potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\psi_M$).....	152
I.4.3. Activation de la voie apoptotique caspase-dépendante.....	154
I.4.4. Induction de la fragmentation de l'ADN.....	159
I.5. Protoporphyrine IX polyaminée et transduction du signal dans les cellules PC-3 ..	163
I.5.1. Activation de la voie p38/MAPK.....	163
I.5.2. Inhibition de la voie PI3K/Akt.....	164
I.5.3. Baisse de l'activation du facteur de survie NF- κ B.....	165
I.6. Protoporphyrine IX polyaminée et voie de la cyclooxygénase-2.....	166
I.6.1. Activation de la voie COX-2/PGE ₂	166
I.6.1.1. Augmentation de l'expression de COX-2.....	166
I.6.1.2. Augmentation de l'activité de COX-2.....	167
I.6.2. Absence d'implication de la voie COX-2/PGE ₂ dans une résistance à l'apoptose.....	168
I.6.2.1. Inhibition chimique de l'activité de COX-2 et ses effets sur l'apoptose dans la lignée cellulaire PC-3.....	168
I.6.2.2. Inhibition de l'expression de COX-2 par transfection de shRNA dans la lignée cellulaire PC-3.....	170
I.6.2.2.1. Acquisition d'une lignée cellulaire PC-3 déficiente pour COX-2.....	170
I.6.2.2.2. Etude des effets de l'inhibition de l'expression de COX-2 sur le taux de fragmentation de l'ADN dans la lignée cellulaire PC-3.....	171
I.6.2.3. Augmentation de l'expression de COX-2 par transfection d'ADN complémentaires (ADNc) dans la lignée cellulaire DU 145.....	172
I.6.2.3.1. Acquisition d'une lignée cellulaire DU 145 exprimant constitutivement COX-2.....	172
I.6.2.3.2. Etude des effets de l'augmentation du niveau d'expression de COX-2 dans la lignée DU 145 sur le taux de fragmentation de l'ADN.....	174
I.6.3. Implication de p38 dans la signalisation de l'apoptose et la voie de COX-2	175
I.7. Protoporphyrine IX et autophagie.....	177
I.7.1. Variations de l'expression des acteurs de la voie autophagique dans la lignée cellulaire PC-3.....	177
I.7.2. Activation de la voie mTOR.....	179
I.7.3. Variation d'expression des acteurs autophagiques dans les lignées cellulaires DU 145 et LNCaP.....	181
I.7.4. Diminution de l'expression de la protéine Bcl-2.....	183
Chapitre II. Expérimentations <i>in vivo</i>	184
II.1. Etude des variations du volume tumoral.....	185
II.2. Absence d'effet des PS sur la structure des tumeurs.....	187
II.3. Diminution de la prolifération des tumeurs.....	188
II.4. Diminution de l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 au sein des tumeurs.....	189



Discussion.....	190
Chapitre I. Etude <i>in vitro</i> des effets de nouveaux photosensibilisateurs pour le traitement du cancer de la prostate par photothérapie dynamique.....	192
I.1. Intérêt de la vectorisation de la PpIX par des polyamines.....	192
I.2. Induction d'un blocage du cycle cellulaire.....	194
I.3. Induction de la mort cellulaire programmée ou apoptose.....	196
I.4. Modulation des voies de transduction du signal et de résistance à l'apoptose.....	198
Chapitre II. Etude <i>in vivo</i> des effets de nouveaux photosensibilisateurs pour le traitement du cancer de la prostate par photothérapie dynamique.....	202
Conclusion et Perspectives	204
Références bibliographiques	211
Table des illustrations.....	227
Table des tableaux	233
Table des matières.....	234
Publications élaborées au cours de la thèse.....	240



PUBLICATIONS ELABOREES

AU COURS DE LA THESE

- **FIDANZI-DUGAS C**, LIAGRE B, CHEMIN G, PERRAUD A, CARRION C, COUQUET CY, GRANET R, SOL V, LEGER DY.
Analysis of the *in vitro* and *in vivo* effects of Photodynamic Therapy on Prostate Cancer by using new photosensitizers, protoporphyrin IX-polyamines derivatives.
Biochim Biophys Acta - General subjects. 2016 (*acceptée avec modifications*)
- RIOU B, POUGET C, **FIDANZI-DUGAS C**, GAMOND A, LAURENT A, SEMAAN J, PINON A, CHAMPAVIER Y, LIAGRE B, DUROUX JL, FAGNERE C, SOL V.
Design and multi-step synthesis of chalcones-polyamine conjugates as potent antiproliferative agents.
Bioorg Med Chem. 2016 (*en soumission*)
- HASSAN L, PINON A, LIMAMI Y, SEMAAN J, **FIDANZI-DUGAS C**, MARTIN F, BADRAN B, SIMON A, LIAGRE B.
Resistance to ursolic acid-induced apoptosis through involvement of melanogenesis and COX-2/PGE₂ pathways in human M4Beu melanoma cancer cells.
Exp Cell Res. 2016 Jul 1;345(1):60-9
- NDONG NTOUTOUME GM, GRANET R, MBAKIDI JP, BRÉGIER F, LÉGER DY, **FIDANZI-DUGAS C**, LEQUART V, JOLY N, LIAGRE B, CHALEIX V, SOL V.
Development of curcumin-cyclodextrin/cellulose nanocrystals complexes: New anticancer drug delivery systems.
Bioorg Med Chem Lett. 2016 Feb 1;26(3):941-5.
- DIAB S, **FIDANZI C**, LEGER DY, GHEZALI L, MILLOT M, MARTIN F, AZAR R, ESSEILY F, SAAB A, SOL V, DIAB-ASSAF MONA, LIAGRE B.
Berberis libanotica extract targets NF- κ B/COX-2, PI3K/Akt and mitochondrial/caspase signalling to induce human erythroleukemia cell apoptosis.
Int J Oncol. 2015 Jul;47(1):220-30
- ISMAIL B, FAGNERE C, LIMAMI Y, GHEZALI L, POUGET C, **FIDANZI C**, OUK C, GUEYE R, BENEYTOUT JL, DUROUX JL, DIAB-ASSAF M, LEGER DY, LIAGRE B.
2'-Hydroxy-4-methylsulfonylchalcone enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells.
Anticancer Drugs. 2015 Jan;26(1):74-84.



FIDANZI-DUGAS C, LIAGRE B, CHEMIN G, PERRAUD A, CARRION C, COUQUET CY, GRANET R, SOL V, LEGER DY.

Analysis of the *in vitro* and *in vivo* effects of Photodynamic Therapy on Prostate Cancer by using new photosensitizers, protoporphyrin IX-polyamines derivatives.

Biochim Biophys Acta - General subjects. 2016 (*acceptée avec modifications*)

Manuscript No.: BBAGEN-16-593

Title: Analysis of the *in vitro* and *in vivo* effects of Photodynamic Therapy on Prostate Cancer by using new photosensitizers, protoporphyrin IX-polyamines derivatives

Article Type: Regular Paper

Journal Title: BBA - General Subjects

Corresponding Author: Prof. Bertrand Liagre

All Authors: Chloe Fidanzi-Dugas, Ph.D. Student; Bertrand Liagre; Guillaume Chemin; Aurelie Perraud; Claire Carrion; Robert Granet; Vincent Sol; David Y Leger

Submit Date: Jul 04, 2016

Dear Prof. Liagre:

Thank you for submitting the above-named article to BBA - General Subjects.

We have completed the evaluation of your manuscript, the reviewer comments are appended below. Your paper could become acceptable for publication pending suitable revision and modification of the article in light of the appended reviewer comments.

Thank you, and we look forward to receiving your revised manuscript.

The revised version of your submission is due by Oct 31, 2016.

Yours sincerely,

Elias Arnér, MD PhD

Executive Editor

BBA - General Subjects



Analysis of the *in vitro* and *in vivo* effects of Photodynamic Therapy on Prostate Cancer by using new photosensitizers, protoporphyrin IX-polyamines derivatives

Chloë Fidanzi-Dugas ^a, Bertrand Liagre ^a, Guillaume Chemin ^a, Aurélie Perraud ^b, Claire Carrion ^c,
Claude-Yves Couquet ^d, Robert Granet ^a, Vincent Sol ^a, David Yannick Léger ^a

^a Université de Limoges, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, EA 1069, 123 avenue Albert Thomas, F-87060 Limoges, France

^b Université de Limoges, Homéostasie Cellulaire et Pathologie, EA 3842, 2 rue du Docteur Marcland, F-87025 Limoges, France

^c Université de Limoges, CIM, UMR CNRS 7276, 2 rue du Dr Marcland, F-87000 Limoges, France

^d Laboratoire de recherche et d'analyses de la Haute-Vienne, Avenue du Professeur Joseph de Léobardy, 87005 Limoges, France

To whom correspondence should be addressed: Prof. Bertrand Liagre, Department of Biochemistry, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges, 2 rue du Docteur Marcland 87025 Limoges, France. Telephone: (+33) 5.55.43.58.39. Fax: (+33) 5.55.43.58.01. Email: bertrand.liagre@unilim.fr

Abbreviations: Photodynamic therapy (PDT), photosensitizer (PS), protoporphyrin IX (PpIX), protoporphyrin IX with two spermidines (PpIX-dSd), protoporphyrin IX with two spermines (PpIX-dSm), polyamine (PA), protoporphyrin IX with polyamines (PpIX-PA), Reactive oxygen species (ROS), Aminolevulinic-acid (ALA), Polyamine Transport Systems (PTS), cyclooxygenase-2 (COX-2), prostaglandin E₂ (PGE₂), N-acetyl-cystein (NAC)



ABSTRACT

Background: Photodynamic therapy, using porphyrins as photosensitizers (PS), has been approved in treatment of several solid tumors. However, commonly used PS induce death but also resistance pathways in cancer cells and an alteration of surrounding normal tissues. Because polyamines (PA) are actively accumulated into cancer cells by the Polyamine Transport System (PTS), they may enable PS to specifically target cancer cells. Here, we investigated whether new protoporphyrin IX-polyamines derivatives represented good PS against prostate cancer and whether PA were appropriated to increase PDT specificity after red light irradiation.

Methods: CHO and CHO-MG cells (different in their PTS activity) were used to assess efficiency of polyamines vectorization. MTT assays were performed on human prostate non-malignant (RWPE-1) and malignant (PC-3, DU 145 and LNCaP) cell lines to test PS phototoxicity. ROS generation, DNA fragmentation and cell signalling were assessed by ELISA/EIA assays, western-blot and gel shift. Finally, PS effects were studied on tumor growth on nude mice.

Results: Our PS were more efficient on cancer cells compared to non-malignant cells and are more efficient than PpIX alone. PpIX-PA induced ROS production involved in induction of apoptotic intrinsic pathway. Pathways involved in apoptosis resistance were studied: PS inhibited Bcl-2, Akt, and NF- κ B but activated p38/COX-2/PGE₂ pathway which was not involved in apoptosis resistance in our model. *In vivo* experiments showed PpIX-PA efficiency compared to PpIX alone.

Conclusions: All together, our results showed that PpIX-PA exerted its maximum effects without activating resistance pathways and appear as good candidates for prostate cancer PDT treatment.

Keywords: prostate cancer, porphyrin, photodynamic therapy, apoptosis, cyclooxygenase



1. Introduction

Prostate cancer is the second most common cancer in men. Current treatment recommendations for prostate cancer consist of a surgical approach (radical prostatectomy) which can be coupled to external radiotherapy, or hormonal therapy [1]. Many of the adverse side effects caused by these types of treatment are due to an alteration of normal tissue. This is why the development of new therapeutic alternatives for focal treatment of prostate cancer is now discussed.

Photodynamic therapy (PDT) is a cancer treatment approach, taking advantage of a photosensitizer which can be distributed into cancer cells and thereafter be activated by focusing light on the tumor site. The activated photosensitizer induces the generation of reactive oxygen species (ROS) within the cells and promotes their death [2]. With the use of modern fiber-optic systems and various types of endoscopy, light can now be targeted accurately to almost any part of the body and reach tumors. PDT has been shown to be a promising therapy for organ confined prostate cancer, both for localized tumor and isolated metastases treatment [3–5]. Furthermore, numerous ongoing clinical studies have been developed to optimize PDT conditions: it is important to fully understand the factors that might counteract the tumoricidal effect of PDT.

The success of Protoporphyrin IX (PpIX) in PDT has been widely shown, mainly using 5-Aminolevulinic-acid (5-ALA)-mediated photodynamic therapy (5-ALA-PDT). ALA is not a photosensitizer but serves as a biological precursor in the heme biosynthetic pathway. In fact, exogenous ALA administration leads to the accumulation of PpIX in the mitochondria, which causes direct mitochondrial damage and subsequent cell death after light irradiation [6].

To enhance the selectivity of commonly used PS and to prevent the necrosis of surrounding normal tissues and skin photosensitivity, photosensitizers can be conjugated to sugars, peptides or hormones, leading to receptor-mediated drug targeting. Porphyrin–polyamine conjugates could be of particular interest as regards of the functions of polyamines [7]. Polyamines, which include spermidine and spermine, are polycations with three or four amine groups. Almost all cells can produce polyamines, but their production is especially high in rapidly growing cells, as tumor cells. In fact, compared to normal surrounding tissues, cancer cells show a higher gene expression and activity of enzymes involved in polyamine biosynthesis [8]. Furthermore, actively growing cells have up-regulated Polyamine Transport Systems (PTS) for exogenous polyamines uptake [8]. Thus, porphyrin–polyamine conjugates could be carried into cells by these transport systems. These findings prompted us to design and synthesize Protoporphyrin IX-polyamine (PpIX-PA) derivatives: the photosensitizer, PpIX, is coupled with two molecules of spermidine (PpIX-dSd) or spermine (PpIX-dSm) attached by a flexible arm (**Fig. 1**) [9].



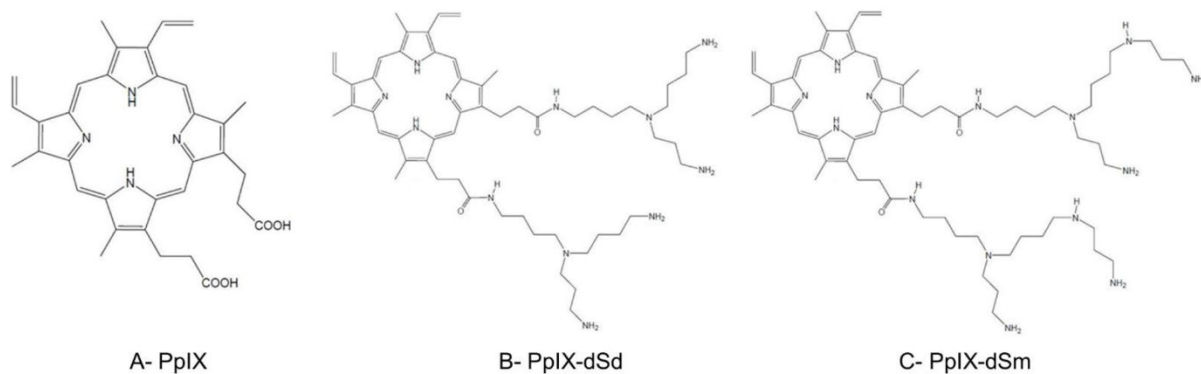


Fig. 1. Structures of photosensitizers. The photosensitizer, PpIX (A), is coupled with two molecules of spermidine (PpIX-dSd) (B) or spermine (PpIX-dSm) (C) attached by a flexible arm. (2-column image)

PDT can lead to an apoptotic response in cancer cells but tumor cells often have an impaired ability to undergo apoptosis, an effect associated with resistance to treatments [10]. Cyclooxygenases (COXs) are inflammatory regulators required for the production of prostaglandins (PGs) from arachidonic acid (AA). Cyclooxygenase-2 (COX-2) isoform has been found to be highly expressed in many types of cancers [11,12], as in prostate cancer [13]. COX-2 contribute to tumorigenesis via the inhibition of apoptosis and the increase of angiogenesis and invasiveness [14–16]. The key regulators of COX-2 are the survival transcriptional factor NF- κ B and the p38/MAPK pro-apoptotic pathway [17]. Currently, the link between COX-2 and PDT efficiency is not well characterized; this effect seems to be cell-type and photosensitizer dependent.

To confirm the interest of coupling polyamines to PS, we studied the PpIX-PA derivatives specificity for cells with up-regulated PTS, as tumor cells, and we compared efficiency of PpIX alone or attached with PA. We studied the ability of these PpIX-PA derivatives to induce apoptosis in human prostate cancer cell lines PC-3, DU 145, LNCaP and the human prostate non-malignant cell line RWPE-1. Effects of PpIX-PA were analyzed by *in vivo* experiments based on PC-3 cells xenografts on nude mice. To have a bigger picture of PpIX-PA application to PDT, our study has been designed for the following purposes: to study the role of polyamines in cancer cells targeting, to clarify the molecular events that mediate PpIX-PA-induced apoptosis and to determine the interaction between COX-2 and apoptosis.



2. Experimental procedures

2.1. Cells lines

Chinese hamster ovary cell lines (CHO and CHO-MG) were provided by the Professor F. Gaboriau (Inserm U991, Rennes, France) and prostate cell lines (RWPE-1, PC-3, DU 145 and LNCaP) were purchased from the American Type Culture Collection (LGC Standards, Middlesex, UK). Cells were grown in RPMI 1640 medium (Gibco BRL, Cergy-Pontoise, France) supplemented with bovine pituitary extract (0.05 mg/ml) and human recombinant epidermal growth factor (5 ng/ml) for RWPE-1 cell line and with 10 % fetal calf serum (ID Bio, Limoges, France) for others cell lines. 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Gibco BRL) were added to media. Cultures were maintained in a humidified atmosphere with 5 % CO₂ at 37 °C. The culture medium was renewed every 3 days. Cells were subcultured by dispersal with trypsin-EDTA and replated at 1x10⁵/ml.

2.2. Photosensitizers

Photofrin® was purchased from Pinnacle Biologics B.V. (Amsterdam, Pays-Bas). Protoporphyrin IX (PpIX) and 5-Aminolevulinic-acid were purchased from Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). A stock solution of 1 mg/ml was prepared in dimethylsulfoxide (DMSO). Protoporphyrin IX-polyamines (PpIX-PA) derivatives were synthesized by our research team [18]. Stock solutions of PpIX-dSd and PpIX-dSm were, respectively, prepared in dimethylsulfoxide (DMSO) and water. PS were diluted in culture medium to give the appropriate final concentration. The same amount of vehicle (percentage of DMSO did not exceed 0.20%) was added to control cells.

2.3. Antibodies

Human antibody against caspase-9 (1:1000) and poly-ADP-ribose polymerase PARP-1 (1:1000) were purchased from Cell Signaling Technology (Ozyme, France). Bcl-2 (1:200) and phospho-Akt (1:200) antibodies were purchased from Santa Cruz Biotechnology (Tebu-Bio, Le Perray en Yvelines, France). COX-2 (1:1000) and β-actin (1:10000) antibodies were respectively purchased from Cayman Chemical (Bertin Pharma, Montigny le Bretonneux, France) and Sigma Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France).

2.4. PDT protocol, *in vitro*

Prostate cancer cells were seeded at 1.5x10⁵ cells/ml in 75 cm² tissue culture flasks and were grown for 24 h in culture medium prior to be either exposed or not to photosensitizers. After 24 h, culture medium was replaced by red-phenol-free culture medium and cells were irradiated or not by red light (630 nm, 75 J/cm²) delivered from the light source PDT TP-1 (Cosmedico Medizintechnik GmbH, Schweningen, Germany). At distinct times after irradiation, cells were removed for various analyses.



2.5. PDT protocol, *in vivo*

Five-week-old female BALB/c nu/nu mice were housed in plastic cages with stainless steel grid tops in an air-conditioned, maintained at room temperature and fed with sterile water and food. Each mouse was injected subcutaneously with 5×10^6 PC-3 cells suspended in 100 μ l of PBS in each side of the dorsal region. At these sites, the tumors were easily accessible to treatment and to assessment of response. After the tumor volume reached about 120 mm³, the tumor-bearing mice were randomly assigned into four different groups: control, PpIX, PpIX-dSd, PpIX-dSm. Each groups had 7 mice. Mice received injection of 10 mg/kg PpIX, PpIX-dSd or PpIX-dSm in the tail vein, followed by light irradiation 24 h later only for one tumor by mice. The control group received only irradiation without administration of any compound. Consequently, 8 conditions were studied: each of the 4 groups was divided in 2 conditions (No irradiation – NI – and Red irradiation – RI). Irradiation was performed with red laser H-séries 660 nm (EdmundOptics). PDT was performed by 2 sequences of 5 min irradiation separated by 5 min (at 660 nm with 100 mW, for a fluence of 200 J/cm²). At 0–21 days after irradiation, the tumor volumes were measured using a caliper. At day 21, mice were sacrificed and tumors were removed for pathological analysis.

2.6. COX-2 shRNA transfection

COX-2 shRNA was purchased from OriGene Technologies (Rockville, MD, USA) and was transfected to PC-3 cells by Lipofectamine® 2000 (InvitroGen). Stable PC-3 cell line was obtained after transfection and selection with 0.5 mg/ml of puromycin (Sigma-Aldrich). COX-2 expression was confirmed by western blot.

2.7. PS toxicity tests

PS toxicity was determined using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays. Cells were seeded at 6×10^5 cells/ml in 96-well culture plates and were grown for 24 h in culture medium prior to be either exposed or not to photosensitizers (Photofrin, 5-ALA, PpIX, PpIX-dSd or PpIX-dSm). After 24 h, culture medium was replaced by red-phenol-free culture medium and cells were irradiated or not by red light (75 J/cm²). MTT assays were used 48 h after irradiation and experiments were performed in three independent assays.

2.8. PS accumulation and localization in prostate cancer cell lines

Prostate cancer cells were seeded in labtecks and were grown in culture medium for 24 h, prior to be either exposed or not to photosensitizers (200 ng/mL). After 24 h, labtecks were washed three times with PBS, and red-phenol-free culture medium was added. PS accumulation was studied by confocal



microscopy (excitation: 405 nm – emission: 690 nm), pictures were taken with a confocal microscope (laser Zeiss LSM 510 Meta – x200) and semiquantitative quantification of the fluorescence in cells has been performed by confocal microscopy analysis using an image processing and analysis program (imageJ) respecting fluorescence intensity and area staining (arbitrary units). To study PS localization, cells were cultured in 10% FCS medium during 24 h, treated or not with PS (IC₅₀) for 24 h and with Mitotracker® (150 ng/mL) or LysoTracker-GFP (30 particles/cell) for respectively 30 min and 16h. Cells were washed three times with PBS and red-phenol-free culture medium was added. PS localization was studied by confocal microscopy (PS: excitation/emission 405/690 nm; organelle probes: excitation/emission 395/509 nm) and pictures were taken with a confocal microscope (laser Zeiss LSM 510 Meta – x200). Images are representative of three independent experiments.

2.9. Cellular ROS detection and inhibition

After treatment and PDT, ROS production was quantified using ABCAM's DCFDA – Cellular Reactive Oxygen Species Detection Assay which use the cell permeant reagent 2',7' – dichlorofluorescein diacetate (DCFDA). After diffusion in to the cell, DCFDA is deacetylated by cellular esterases to a non-fluorescent compound, which is later oxidized by ROS into 2', 7' –dichlorofluorescein (DCF). DCF is a highly fluorescent compound which can be detected by fluorescence spectroscopy (excitation: 485 nm; emission: 535 nm). Control positive used is Tert-Butyl Hydrogen Peroxide (TBHP). ROS detection was performed according to the manufacturer's instructions.

The ROS scavenger N-acetyl-L-cysteine (NAC) was purchased from Sigma-Aldrich (St-Louis, MO, USA). Prostate cancer cells were seeded at 1.5x10⁵ cells/ml in 75 cm² tissue culture flasks and were grown for 24 h in culture medium prior to be either exposed or not to photosensitizers. After 24 h, culture medium was replaced by red-phenol-free culture medium. We pretreated some cells with NAC (10 mM) for 1 h before cells were irradiated by red light (630 nm, 75 J/cm²). At distinct times after irradiation, cells were removed for various analyses.

2.10. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)

$\Delta\psi_m$ was estimated using 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazole carbocyanide iodide (JC-1, Molecular Probes), as previously described [19]. PC-3, DU 145 and LNCaP cells were grown in labtecks for 24 h before treatment with IC₅₀ PpIX-dSd or PpIX-dSm and PDT or not 24h later. Control cells were grown in medium containing the same amount of vehicle as treated cells. At 24 h, cells were incubated in medium containing JC-1 (1 µg/ml) for 30 min at 37°C and pictures were taken with a confocal microscope (laser Zeiss LSM 510 Meta – x200).

2.11. Protein expression



After treatment and PDT, cells were washed and lysed in RIPA lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, 20 µg/ml aprotinin) containing protease inhibitors (Complete™ Mini, Roche Diagnostics, Meylan, France). The protein level was determined using the Bradford method. Briefly, as previously described [20], proteins (10-100 µg) were separated by electrophoresis on SDS-polyacrylamide gels, transferred to PVDF membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Saclay, France) and probed with human primary antibodies. After incubation with secondary antibodies (Dako France S.A.S., Trappes, France and Cell Signaling Technology, Ozyme, France), blots were developed using the ECL Plus Western Blotting Detection System (Amersham Pharmacia Biotech) and G: BOX system (Syngene, Ozyme, Saint Quentin en Yvelines, France). Membranes were then reblotted with anti-β-actin (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) used as a loading control.

2.12. Caspase-3 activation and DNA fragmentation

After treatment and PDT, caspase-3 activity was assayed using Quantikine® human active caspase-3 (R&D Systems) as previously described [19] and apoptosis was quantified on pooled cells (floated and adherent) using “cell death” enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Cell Death Detection ELISAPLUS, Roche Diagnostics). Cytosol extracts were obtained according to the manufacturer's protocol and apoptosis was measured as previously described [21].

2.13. Quantification of MAP kinase activation by ELISA

After treatment and PDT, 10⁶ cells were homogenized in a lysis buffer containing protease and phosphatase inhibitors in accordance with the manufacturer's protocol (R&D Systems, Lille, France). Phospho-p38 detection was performed according to the manufacturer's instructions (R&D Systems) as previously described [22].

2.14. NF-κB nuclear translocation

Subcellular protein fractionation – 12, 24 and 48 h after treatment and PDT, cells were recovered and cytosolic and nuclear fractions were obtained using the Subcellular Protein Fractionation Kit according to the manufacturer's protocol (Thermo Fischer Scientific, Rockford, IL, USA) as previously described [22]. The protein level was determined using the Bradford method.

Electromobility shift assay (EMSA) – EMSA experiments were performed using DIG Gel Shift kit (Roche Diagnostics). Briefly, nuclear extracts were prepared from PC-3 cells and NF-κB binding reactions were carried out with 10 µg nuclear proteins incubated with digoxigenin (DIG) labeled NF-κB probe according to the manufacturer's protocol, as previously described [23].

2.15. Statistical analysis



Data are expressed as the arithmetic means \pm standard error of the mean (SEM) of separate experiments. The statistical significance of results obtained from *in vitro* and *in vivo* studies was evaluated by the two tailed unpaired Student's t-test, with $p < 0.05$ being considered as significant.



3. Results

3.1. PpIX-PA derivatives seems to be more efficient in cells with up-regulated Polyamine Transport Systems (PTS)

To confirm the polyamines in targeting cells with up-regulated PTS, we compared PpIX and PpIX-PA toxicity on CHO cells and PTS-deficient CHO-MG cells. First, without photoactivation, PS were not toxic for cells. However, when PS were photoactivated by red light, PS had toxic effects in a dose-dependent manner on CHO (**Fig. 2A**) and CHO-MG cells (**Fig. 2B**). In both cell lines, PpIX was 7 to 14-fold more efficient when it was vectorized with PA. Also, PpIX-PA seemed to be 1.4 to 1.6-fold more efficient on cell line CHO compared to PTS-deficient cell line CHO-MG (**Fig. 2C**).

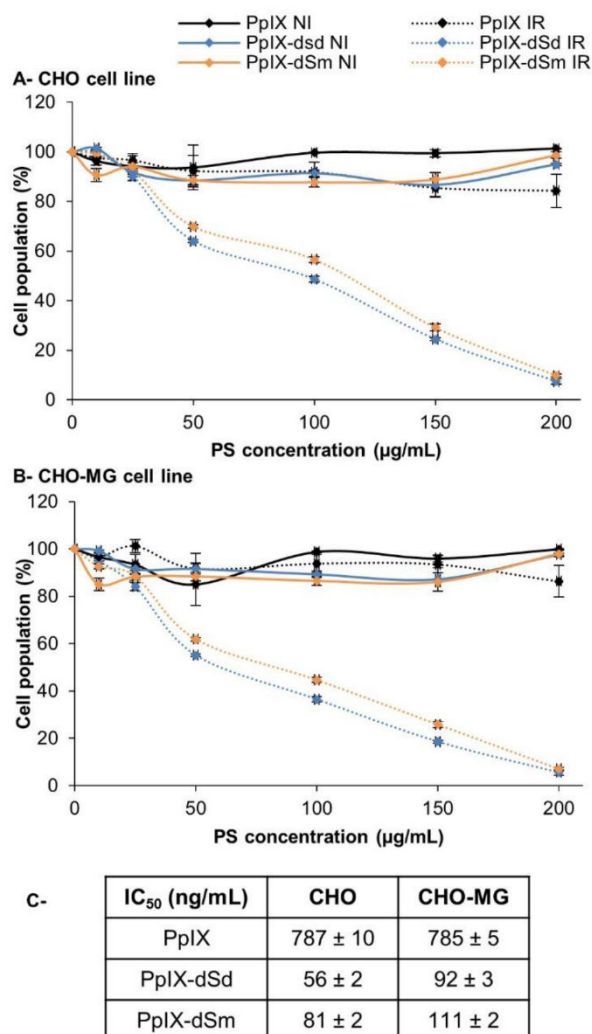


Fig. 2. Phototoxic effects of PpIX and PpIX-PA derivatives on CHO (A) and CHO-MG (B) cell lines. Cells on 96-well plates were cultured in 10% FCS medium during 24 h, treated or not with PS for 24 h and kept in the dark (NI – No Irradiation) or irradiated by red light (RI – Red Irradiation – 75 J/cm²). PS toxicity at 48 h was followed by MTT test and IC₅₀ values were calculated (C). Data represent three independent experiments, error bars indicate the average ± standard error mean). (*1-column image*)



3.2. Polyamines enhanced PpIX-PA-PDT effects

The phototoxicity of Photofrin (50-2000 ng/mL) and 5-ALA (10-1000 µg/mL), two commonly used PS, was studied on two androgen-independent prostate cancer cell lines (PC-3 and DU 145) and on one androgen-dependent prostate cancer cell line (LNCaP) (**Fig. 3A**). Toxicity of PpIX or PpIX-PA (10–200 ng/mL) was also studied on these three prostate cancer cells and one prostate non-malignant cell line (RWPE-1) (**Fig. 3B**). This effect was determined after 48 h using the MTT assay. PS proved to have no toxic effect on cells when cells were kept in the dark. Furthermore, when PS were photoactivated by red light, they shew a strong toxicity on cell lines. IC₅₀ values were calculated (**Fig. 3C**) in order to compare PS effects. When photoactivated PpIX was used at 200 ng/mL, PS did not have phototoxicity on PC-3 cells. So more important concentrations (500, 1000 and 1500 ng/mL) were used (data not shown) to determinate IC₅₀ in this cell line.

We compared PS effects on cells and we observed that PpIX-PA was about 2 fold more efficient on prostate cancer cell lines compared to non-malignant cells. Also, we compared PpIX and PpIX-PA toxicity and we showed that PpIX alone is less efficient in the three prostate cancer cell lines. In fact, compared to PpIX alone, PpIX-dSd was 12 fold more efficient in PC-3 cells, 5 fold in DU 145 cells and 3.5 fold in LNCaP cells. Also, PpIX-dSm was 15 fold more efficient in PC-3 cells, 8 fold in DU 145 cells and 6 fold in LNCaP cells. PS had approximatively the same efficiency on DU 145 and LNCaP cell lines with respective IC₅₀ about 77 and 75 ng/mL for PpIX-dSd or 43 and 44 ng/mL for PpIX-dSm. However, PC-3 cell line seemed to be the most resistant cell line as IC₅₀ for PpIX, PpIX-dSd and PpIX-dSm were higher than those found for DU 145 and LNCaP cell lines (3 to 4, 1.2 and 1.8 fold respectively). Also, our new PS appeared more efficient than Photofrin and 5-ALA: IC₅₀ for these two commonly used PS were more important (>619 ng/mL) than PpIX-PA IC₅₀ (<94 ng/mL) in prostate cancer cell lines studied. For following experiments the compounds were used at IC₅₀ values.



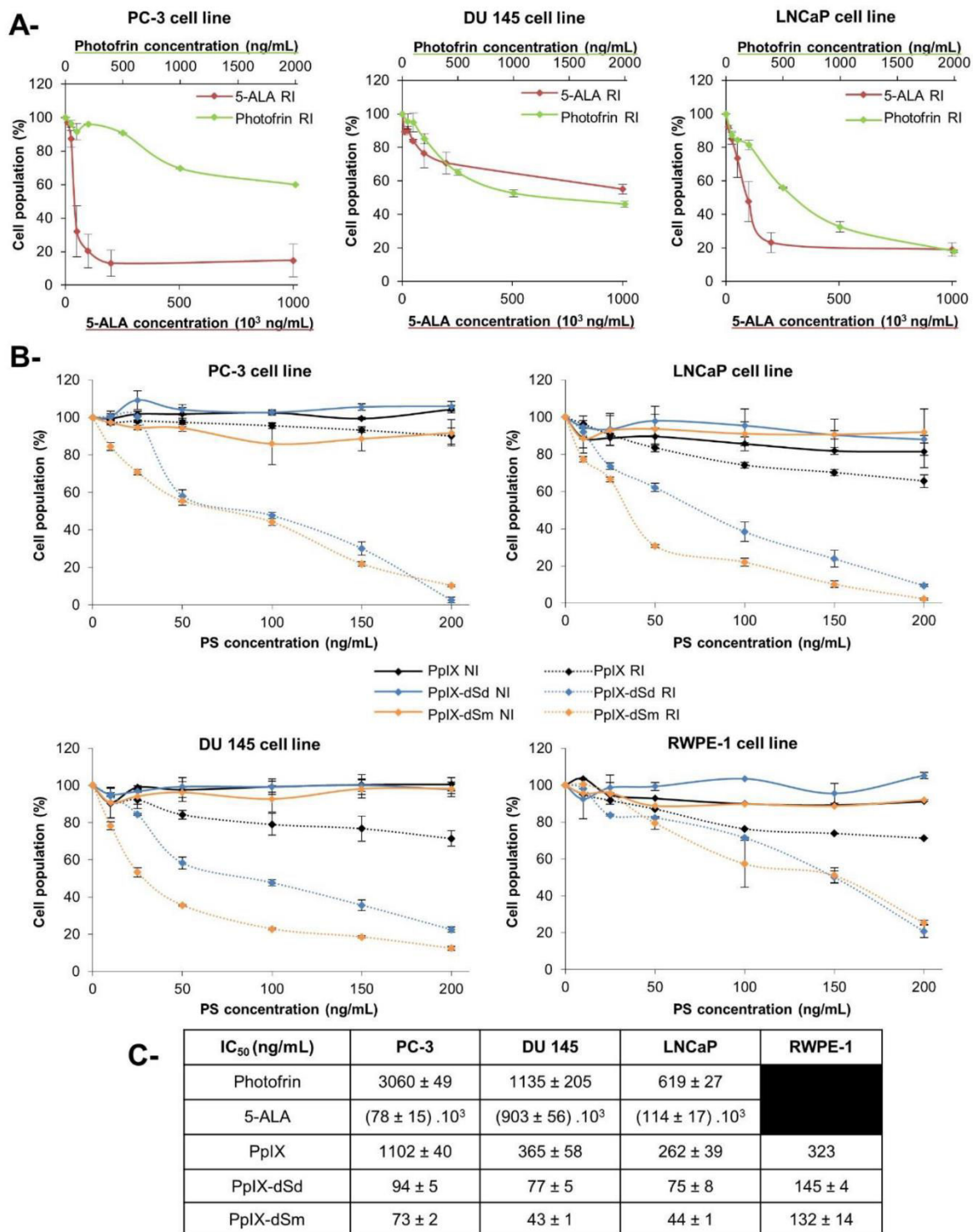


Fig. 3. PS phototoxicity on prostate cell lines. Prostate cancer cell lines PC-3, DU-145, LNCaP and prostate non-malignant cell line RWPE-1 on 96-well plates were cultured in correspondent medium during 24 h, treated or not with PS (Photofrin, 5-ALA (**A**), PpIX, PpIX-dSd and PpIX-dSm (**B**)) for 24 h and kept in the dark (NI-No Irradiation) or irradiated by red light (RI – Red Irradiation - 75 J/cm²). PS toxicity at 48 h was followed by MTT test



and IC₅₀ values were calculated (C). Data represent three independent experiments, error bars indicate the average ± standard error mean). (2-column image)

3.3. PA increased accumulation of PpIX in the cytoplasm of prostate cancer cells

As the most of PS, PpIX is naturally fluorescent (excitation/emission: 405/690nm). So its uptake in human prostate cancer cells from both formulations – PpIX, PpIX-PA – was studied by confocal microscopy. Used in same concentration (200 ng/mL), PS uptake by the three cells lines showed a marked difference in PpIX levels compared with untreated control group (Fig. 4A). Cells incubated with PS for 24h had detectable PpIX level in cytosol with a highest accumulation for PpIX-PA compared to PpIX alone: fluorescence intensity was more important for PpIX-PA compared to PpIX alone. PpIX-dSd seemed to be more captured by PC-3 and DU 145 cells compared to PpIX-dSm. Conversely, LNCaP cells seemed to contain more PpIX-dSm compared to PpIX-dSd. Also, for these three PpIX formulations, no PS co-localization with mitochondria or lysosomes was observed (Fig. 4B). So these experiments demonstrated that polyamines enhance PpIX uptake by cells but had no influence on PS intracellular localization.



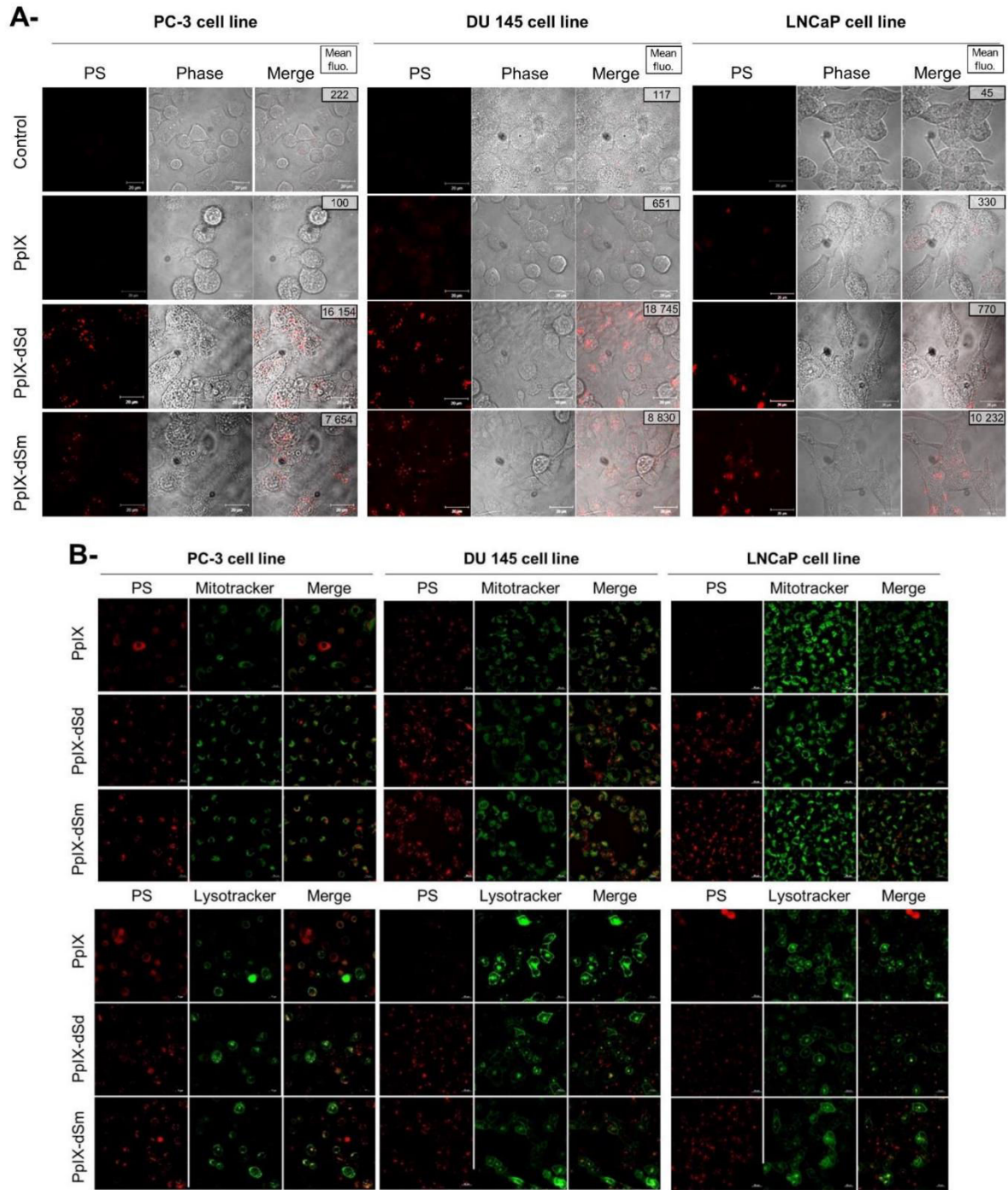


Fig. 4. PS accumulation and localization in human prostate cancer cells PC-3, DU-145 and LNCaP. **(A)** Cells were cultured in 10% FCS medium during 24 h, treated or not with PpIX-PA (200 ng/mL) for 24 h. Cells were washed three times with PBS and red-phenol-free culture medium was added. PS accumulation was studied by confocal microscopy (excitation: 405 nm – emission: 690 nm), pictures were taken with a confocal microscope (laser Zeiss LSM 510 Meta – x200) and semiquantitative quantification of the fluorescence in cells has been performed using an image processing and analysis program (imageJ) respecting fluorescence intensity and area staining (arbitrary units). **(B)** Cells were cultured in 10% FCS medium during 24 h, treated or not with PpIX-PA (IC_{50}) for 24 h and with Mitotracker® (150 ng/mL) or Lysotracker-GFP (30 particles/cell) for respectively 30 min and 16h. Cells were



washed three times with PBS and red-phenol-free culture medium was added. PS localization was studied by confocal microscopy (PS: excitation/emission 405/690 nm ; organelle probes : excitation/emission 395/509 nm) and pictures were taken with a confocal microscope (laser Zeiss LSM 510 Meta – x200). Images are representative of three independent experiments. *(2-column image)*

3.4. PpIX-PA induced ROS production in prostate cancer cells

As most of PS, PpIX-PA induced ROS production only when they were photoactivated (**Fig.5**). In PC-3 and DU 145 cell lines, PpIX-dSd induced more ROS production than PpIX-dSm. In fact, PS induced respectively a fold of 2.2 vs. 1.7 in PC-3 cells, and 2.3 vs 1.8 in DU 145 cells compared to not irradiated cells. Inversely, in LNCaP cell line, PpIX-dSd induced less ROS production (fold of 1.5) compared to PpIX-dSm (fold of 2.1). This production of ROS is often involved in apoptosis induction in case of PDT.

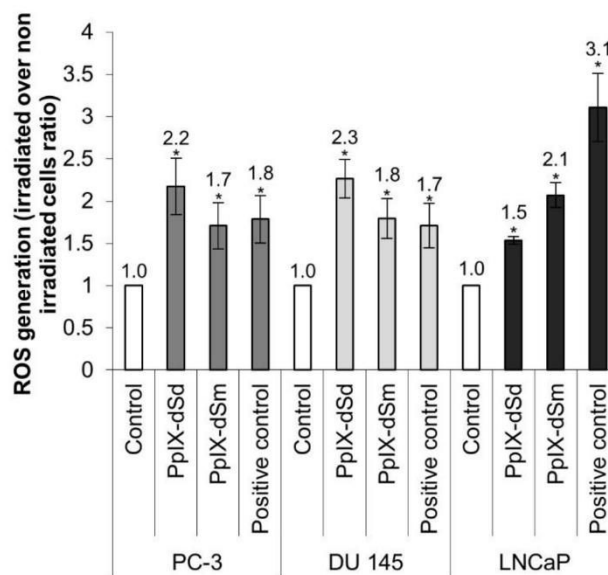


Fig. 5. PpIX-PA induced ROS production in prostate cancer cell lines PC-3, DU 145 and LNCaP. Cells were cultured in 10% FCS medium during 24 h, treated or not with PpIX-PA (IC_{50}) for 24 h, incubated with DCFDA ($20\mu M$) during 30 min. at $37^{\circ}C$ and irradiated by red light ($75 J/cm^2$). DCF produced by ROS can be detected by fluorescence spectroscopy (excitation: 485 nm; emission: 535 nm). Tert-Butyl Hydrogen Peroxide (TBHP) is used as control positive ($50\mu M$). Results represent ROS generation in irradiated over non irradiated cells ratio. *(1-column image)*

3.5. PpIX-PA induced apoptosis via the intrinsic pathway

To determine potential mechanisms by which PpIX-PA inhibited prostate cancer cell viability; we studied its effects on $\Delta\psi_m$, because alterations in mitochondrial structure and function have been shown to play a crucial role at early stages of apoptosis. $\Delta\psi_m$ was analyzed after 24 h treatment with PpIX-PA using JC-1 probe. As shown in **Fig. 6A**, we found that light or PS alone had no effect on $\Delta\psi_m$ compared to control cells: red fluorescence corresponded to cytosolic JC-1 aggregate formation at high membrane potentials. In contrast, PpIX-PA decreased the $\Delta\psi_m$ when PS were photoactivated by red light, as shown by the



incorporation of JC-1 monomers into mitochondria (green fluorescence). So, PS had the same effect in the three cell lines.

To determine potential involvement of ROS production in PpIX-PA-induced apoptosis in human prostate cancer cell lines, we studied the effects of N-acetyl-cystein (NAC), a ROS inhibitor, on $\Delta\psi_m$. After 24 h treatment with PpIX-PA following by 1 h treatment with NAC before red irradiation, $\Delta\psi_m$ was analyzed 24h after PS photoactivation. As shown in **Fig. 6A**, we found that PpIX-PA coupled with NAC had no effect on $\Delta\psi_m$ compared to control cells. So, the addition of NAC canceled the decrease of $\Delta\psi_m$ induced by photoactivated PpIX-PA.

We then examined the effect of PpIX-PA on the activation of initiator caspases, caspase-8 and caspase-9. PS did not activate caspase-8 (data not shown). However, when PS are photoactivated, we observed an activation of caspase-9 by cleavage in PC-3, DU 145 and LNCaP cell lines (**Fig. 6B**). Consequently, PS induced activation of executive caspase-3 activity (5.4 to 8.7 ng/ml versus 4 ng/ml for PC-3 control cells, 7 to 14.3 ng/ml versus 5.9 ng/ml for DU 145 control cells and 7.1 to 10.3 ng/ml versus 4.4 ng/ml for LNCaP control cells) (**Fig.6C**). These observations were directly correlated with PARP-1 cleavage because western blot analysis detected a diminution of native form of PARP-1 expression and induced an increase of cleaved form of PARP-1 expression only when PS was photoactivated (**Fig. 6B**). Also, PpIX-PA photoactivated induced PARP-1 cleavage, corresponding to its inactivation.



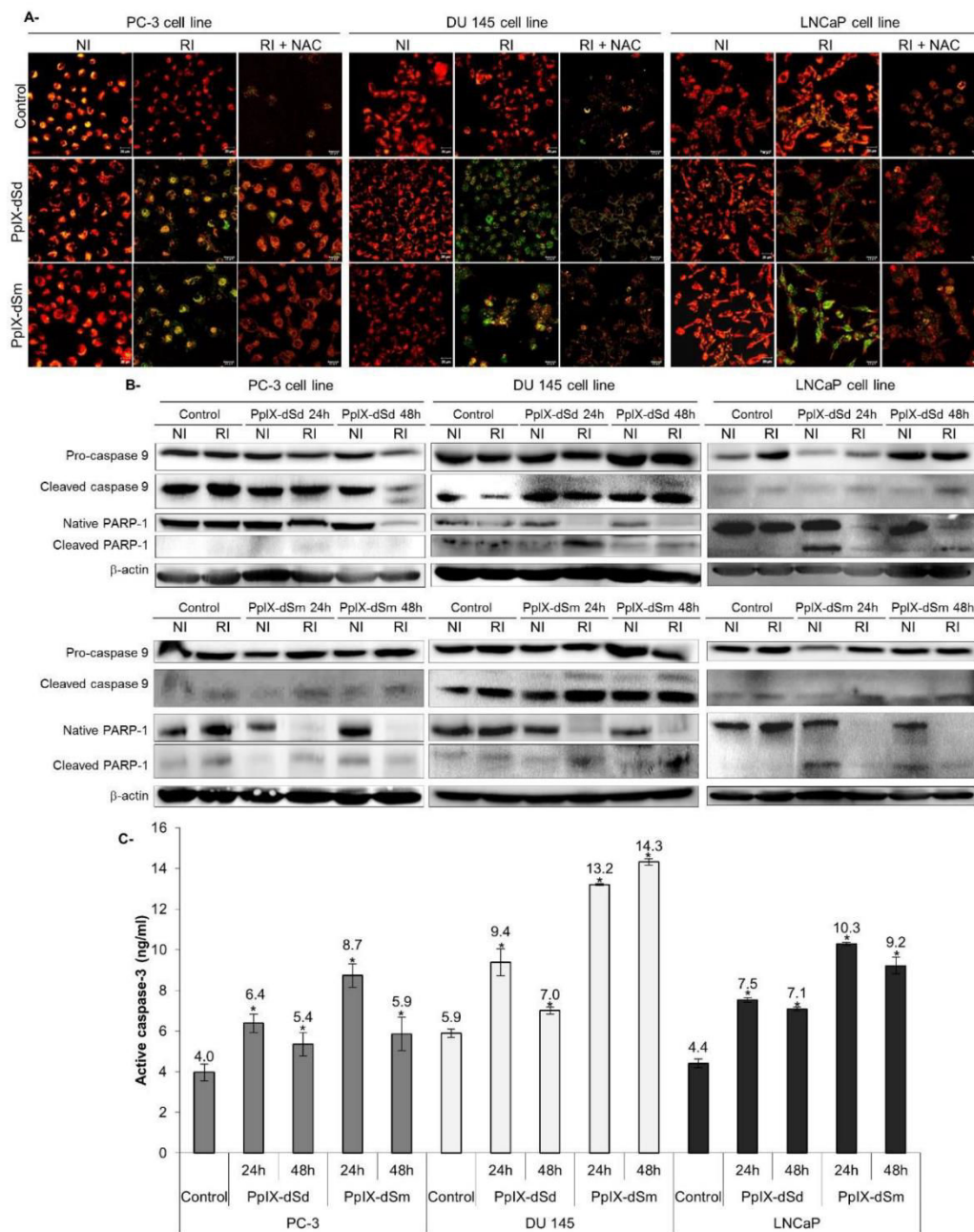


Fig. 6. PpIX-PA induced apoptosis via the intrinsic pathway in prostate cancer cell lines PC-3, DU 145 and LNCaP. Cells were cultured in 10% FCS medium during 24 h, treated or not with PpIX-PA (IC_{50}) for 24 h, treated or not with NAC (10 mM) and irradiated (RI) or not (NI) by red light (75 J/cm²). **(A)** After 24 h, cells were incubated with medium containing JC-1 (1 μg/ml) for 30 min at 37°C. Red fluorescence represents mitochondria with intact membrane potential whereas green fluorescence represents de-energized mitochondria. Pictures were taken with a confocal microscope (laser Zeiss LSM 510 Meta – x200). The pictures are representative of two separate experiments. **(B)** After 24 and 48 h, caspase-9 expression and PARP-1 cleavage were determined by western-blot. β-actin was used as a loading control. Blots are representative of three separate experiments. **(C)** After 24 and 48 h, caspase-3 activation was measured according to manufacturer's instructions (Quantikine® human active caspase-3 (R&D Systems). Values are expressed as mean±SEM (p-value relative to control group, * p<0.05). *(2-column image)*



Without PARP-1 repair, DNA is submitted to endonucleases action. An ELISA test evaluated the formation of cytoplasmic-histone-associated DNA fragments. DNA fragmentation was increased at 24 h and 48 h after treatment with PpIX-PA only in case of photoactivation in the three prostate cancer cell lines. (Fig. 7).

Also, DNA fragmentation was studied in presence of NAC. The association PpIX-PA/NAC had no effect on DNA fragmentation compared to control cells (Fig. 7). So, the inhibition of ROS by NAC blocked PpIX-PA-induced apoptosis.

Also, when non-malignant prostate cells were treated with a dose of PS corresponding to IC₅₀ for cancer cells PC-3, the most resistant cells, PS induced DNA fragmentation. However, when these cells were treated by a lower dose corresponding to PC-3 IC₅₀, PS had no effect on DNA fragmentation (Fig. 7).

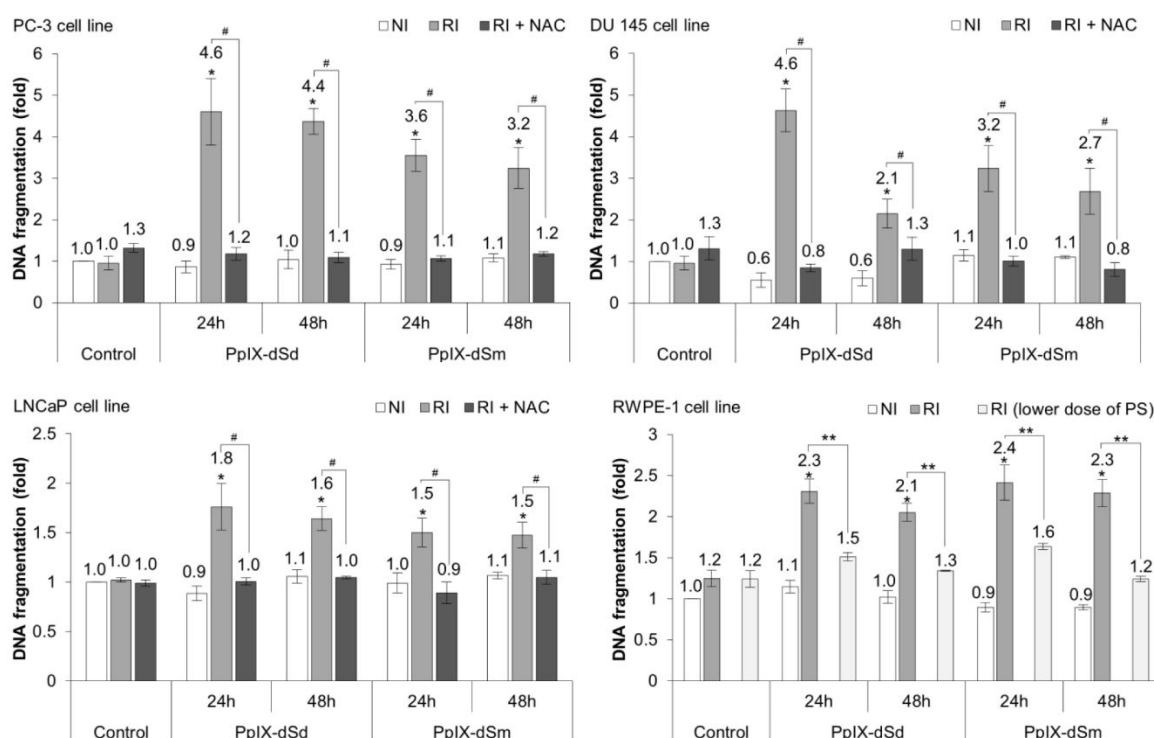


Fig. 7. PpIX-PA induced DNA fragmentation via ROS production in prostate cancer cell lines PC-3, DU 145 and LNCaP and non-malignant prostate cell line RWPE-1. Cancer cells were cultured in 10% FCS medium during 24 h, treated or not with PpIX-PA (IC₅₀) for 24 h, treated or not with NAC (10 mM) for 1h and irradiated (RI) or not (NI) by red light (75 J/cm²). Non-malignant cells were cultured in 10% FCS medium during 24 h, treated or not with PpIX-PA at different doses (IC₅₀ corresponding or at PC-3 IC₅₀, a lower dose) DNA fragmentation was quantified from cytosol extracts according to the manufacturer's instructions (Cell Death Detection ELISA plus, Roche Diagnostics). Results were reported as n-fold compared to controls. Values are expressed as mean±SEM (p<0.05 : * p-value relative to control group, # p-value with or without NAC, ** p-value relative to RWPE-1 cells treated by IC₅₀ or by a lower dose). (2-column image)



For the following experiments, we studied PpIX-PA effects on pathways known as inducers of apoptosis resistance, and this, only on PC-3 cell line which appeared as the most resistant cell line to our PS, regarding IC₅₀ values.

3.6. PpIX-PA increased COX-2 expression and PGE₂ production

COX-2/PGE₂ pathway is often up-regulated in case of PDT. This particularly happen in case of treatment by Photofrin® [24] or hypericin [25]. Depending on cell type and PS type, this up-regulation is involved in resistance to apoptosis [26] or not [25]. Here, we showed that PpIX-PA induced overexpression of COX-2 at 24 h and 48 h only when it was photoactivated (**Fig. 8A**). These results were correlated with prostaglandin E₂ (PGE₂ – main metabolite of COX-2) assay performed in the culture supernatants: in fact, it was only in presence of red light that PpIX-PA increased the PGE₂ concentration (**Fig. 8B**). As the majority of PS, our PpIX-PA induced an up-regulation of COX-2/PGE₂ pathway. The question is to know if the increase of this pathway is involved in a resistance to apoptosis or not.

3.7. Decrease of COX-2 expression by shRNA transfection had no effect on apoptosis

Numerous studies have shown that increased COX-2 expression prevents apoptosis in cancer cells. We transfected PC-3 cell line with shRNA targeting COX-2 (**Fig. 8C**), and analyzed effects of this change of COX-2 expression on apoptosis induction. If COX-2 was involved in apoptosis resistance, shRNA transfection would lead to an increase of DNA fragmentation. However, in our model, we showed that this change had no effect on DNA fragmentation in transfected PC-3 cell line (**Fig. 8D**). So, all of this results showed that COX-2/PGE₂ pathway seemed not be involved in apoptosis resistance in our model.



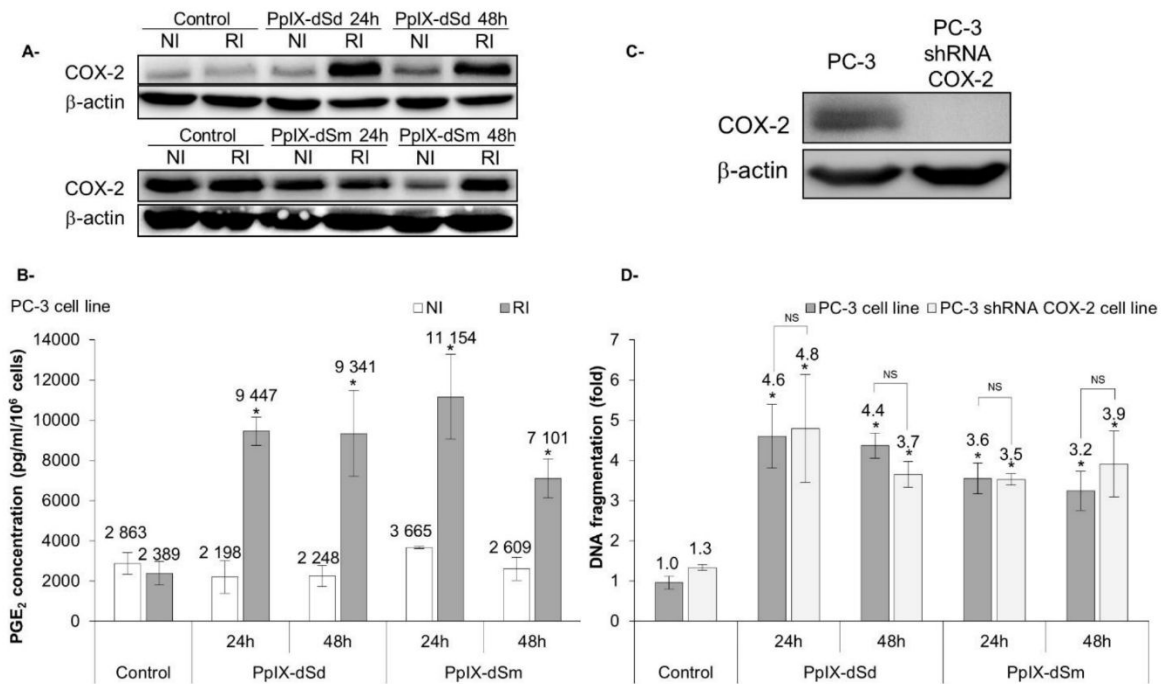


Fig. 8. Effects of PpIX-dSm on COX-2 expression and activity in PC-3 cell line and role of COX-2 on PpIX-PA – induced apoptosis. Cells were cultured in 10% FCS medium during 24 h and treated or not with PpIX-PA for 24 h and irradiated (RI) or not (NI) by red light (75 J/cm²). **(A)** After 24 and 48 h, COX-2 expression was determined by western-blot. β -actin was used as a loading control. Blots are representative of three separate experiments. **(B)** After 24 and 48 h, PGE₂ production was measured in culture supernatants according to the manufacturer’s instructions (PGE₂ EIA Kit, Cayman Chemical). Values are expressed as mean \pm SEM (P-value relative to control group, * p<0.05). PC-3 cells were transfected with COX-2 shRNA by Lipofectamine® 2000. Stable PC-3 cell line was obtained after selection with 0.5 mg/ml of puromycin. **(C)** COX-2 expression was confirmed by western blot. β -actin was used as a loading control. **(D)** Cells were cultured in 10% FCS medium during 24 h and treated or not with PpIX-PA for 24 h and irradiated by red light (75 J/cm²). After 24 and 48 h, DNA fragmentation was quantified from cytosol extracts according to the manufacturer’s instructions (Cell Death Detection ELISA plus, Roche Diagnostics). Results were reported as n-fold compared to controls. Values are expressed as mean \pm SEM (P-value relative to control group, * p<0.05). **(2-column image)**

3.8. PpIX-PA modulated p38 α activation

Having shown that PpIX-PA induced apoptosis in human prostate cancer cells, we analyzed the effect of this PS on activation of p38/MAPK in PC-3 cell line. This pathway is known to be a proapoptotic pathway but also, a positive regulator of COX-2/PGE₂ pathway. We showed that PS induced p38 α activation which last for 1h and was observed again after 12h (**Fig. 9A**). The inhibition of p38/MAPK using SB203580 induced an inhibition of COX-2 overexpression induced by PS photoactivated which prove that COX-2/PGE₂ pathway is regulated by p38/MAPK in our model (**Fig. 9B**). Also, in presence of SB203580, we observed an inhibition of DNA fragmentation induced by photoactivated PS (**Fig. 9C**), correlating the p38/MAPK activation with induced apoptosis. So, in our model, p38/MAPK is a proapoptotic pathway and a COX-2 positive regulator.



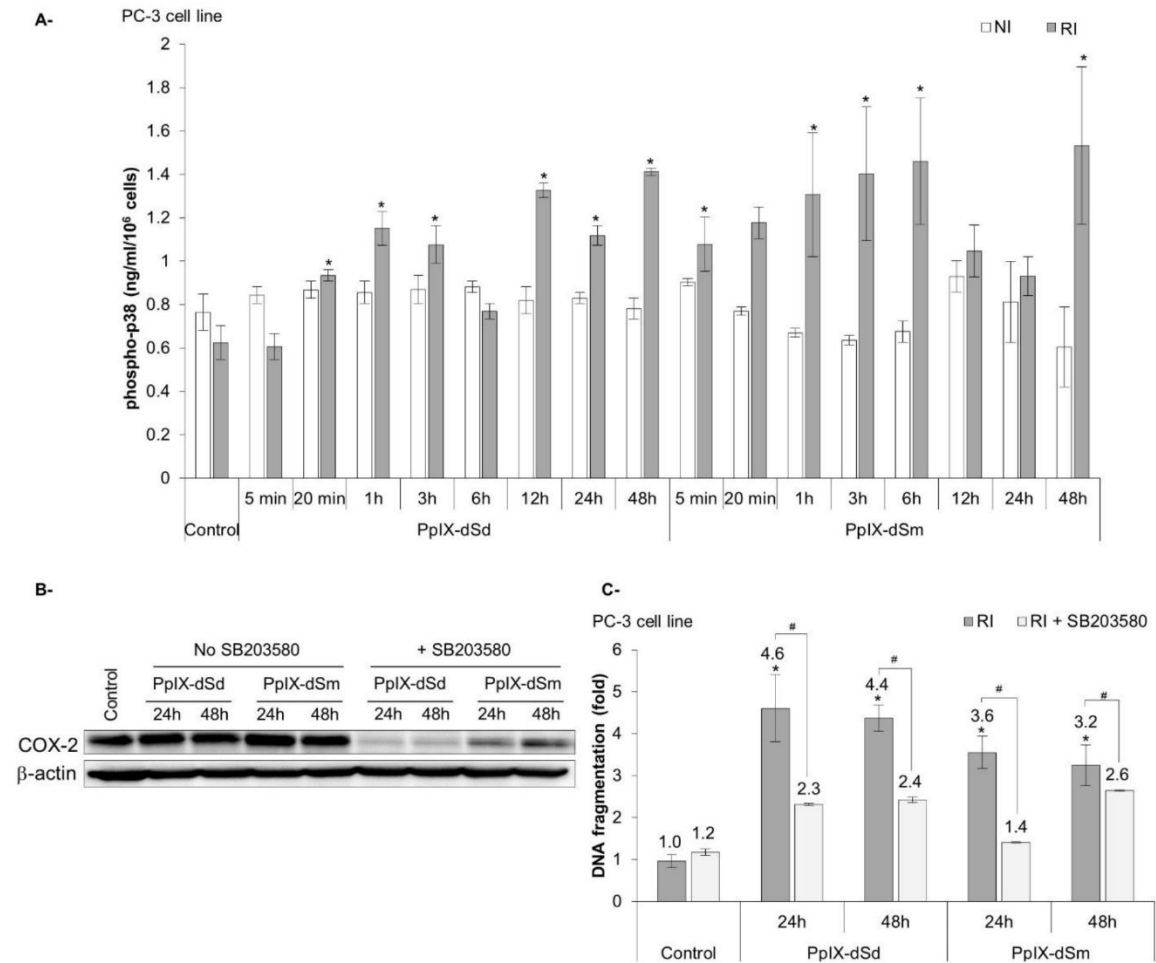


Fig. 9. Effects of PpIX-PA on p38 activation and effects of its inhibition on DNA fragmentation in PC-3 cell line. **(A)** Cells were cultured in 10% FCS medium during 24 h and treated or not with PpIX-PA for 24 h and irradiated or not by red light (75 J/cm²). p38 phosphorylation was quantified with the Duo Sets IC assay kits (R&D Systems). Each value represents the mean±SEM from three separate experiments (P-value relative to control group, *p<0.05). **(B)** Cells were cultured in 10% FCS medium during 24 h and treated or not with SB203580 (a p38/MAPK inhibitor) 2 h after treatment with PpIX-PA. After 24 h, cells were irradiated by red light (75 J/cm²). COX-2 expression was confirmed by western blot. β-actin was used as a loading control. **(C)** DNA fragmentation was quantified from cytosol extracts according to the manufacturer's instructions (Cell Death Detection ELISA plus, Roche Diagnostics) in PC-3 cells. Results were reported as n-fold compared to controls. Values are expressed as mean±SEM (P-value relative to control group, * p<0.05, P-value with or without SB203580, # p<0,05). **(2-column image)**

3.9. PpIX-PA decreased pathways known to be involved in apoptosis resistance

Apoptosis induction is often used as a cancer treatment strategy. However, signaling pathways can be up-regulated within cancer cells to resist to this phenomenon and could be the cause of treatment resistance. Bcl-2, an anti-apoptotic protein, survival pathway Akt, and the survival transcriptional factor NF-κB, known to be a positive regulator of COX-2, are known as resistance to apoptosis inducers. We



showed that PpIX-PA induced a decrease of Bcl-2 expression at 24 h and 48 h only when PS were photoactivated (**Fig. 10A**). Also, PpIX-PA induced an inhibition of Akt activation, as shown by the decrease of p-Akt expression at 24 h and 48 h only when PS were photoactivated (**Fig 10A**). Since NF- κ B activation is critical for apoptosis resistance, we examined the effect of PpIX-PA on nuclear activation of NF- κ B in this cell line. Our results showed that PS inhibited NF- κ B activation at 12 h, 24 h and 48 h only when it was photoactivated by red light (**Fig. 10B**). So, the inactivation of NF- κ B can't be correlated with COX-2 overexpression but with PS-induced apoptosis.

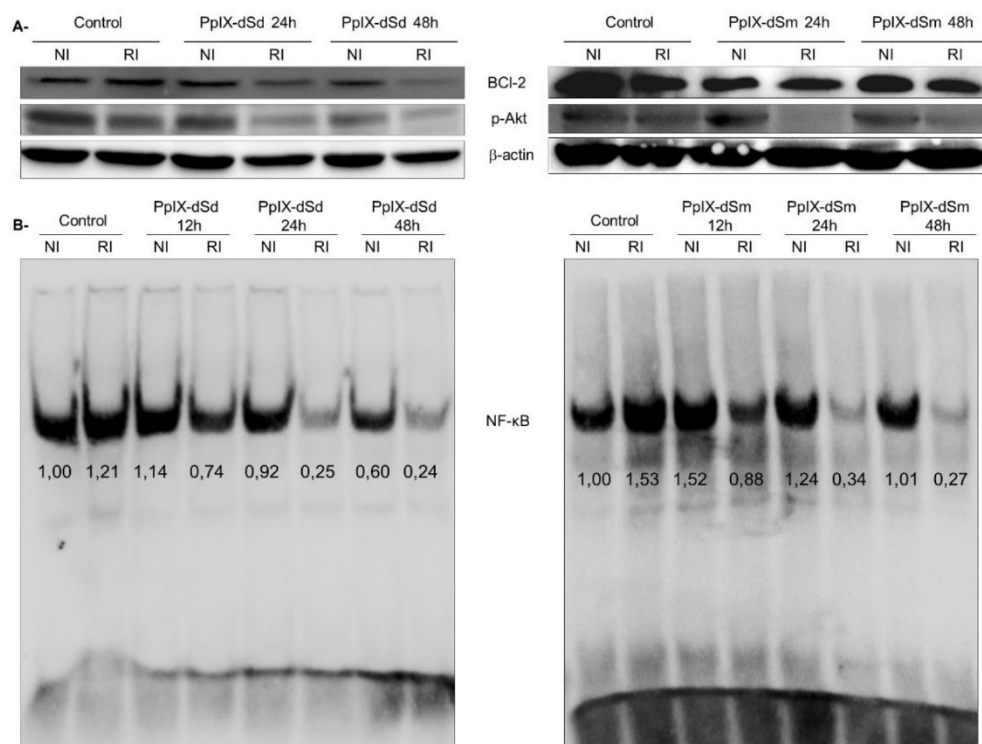


Fig. 10. Effects of PpIX-PA on pathways known to be involved in apoptosis resistance in PC-3 cell line. **(A)** After 24 and 48 h, Bcl-2, p-Akt expression was determined by western-blot. β -actin was used as a loading control. Blots are representative of two separate experiments. **(B)** EMSA experiments were performed using DIG Gel Shift Kit (Roche Diagnostics) on nuclear extracts. Units arbitrary were calculated by ImageJ software. **(2-column image)**

3.10. PpIX-dSd induced inhibition of tumor growth of PC-3 xenografts in nude mice

We studied PS effects on tumor growth by measuring tumor volumes during 21 days after irradiation (**Fig. 11, A-B**). In control group (mice untreated with PS), no significant difference in tumor volume between the irradiated and non-irradiated tumors were detected: light alone had no effect on tumor growth. In PpIX and PpIX-dSm groups, PS alone did not change tumor growth, and tumor irradiation did not reveal any significant difference on tumor volumes compared to control group. In PpIX-dSd group, photoactivated PS induced a slowing tumor growth after 10 days.



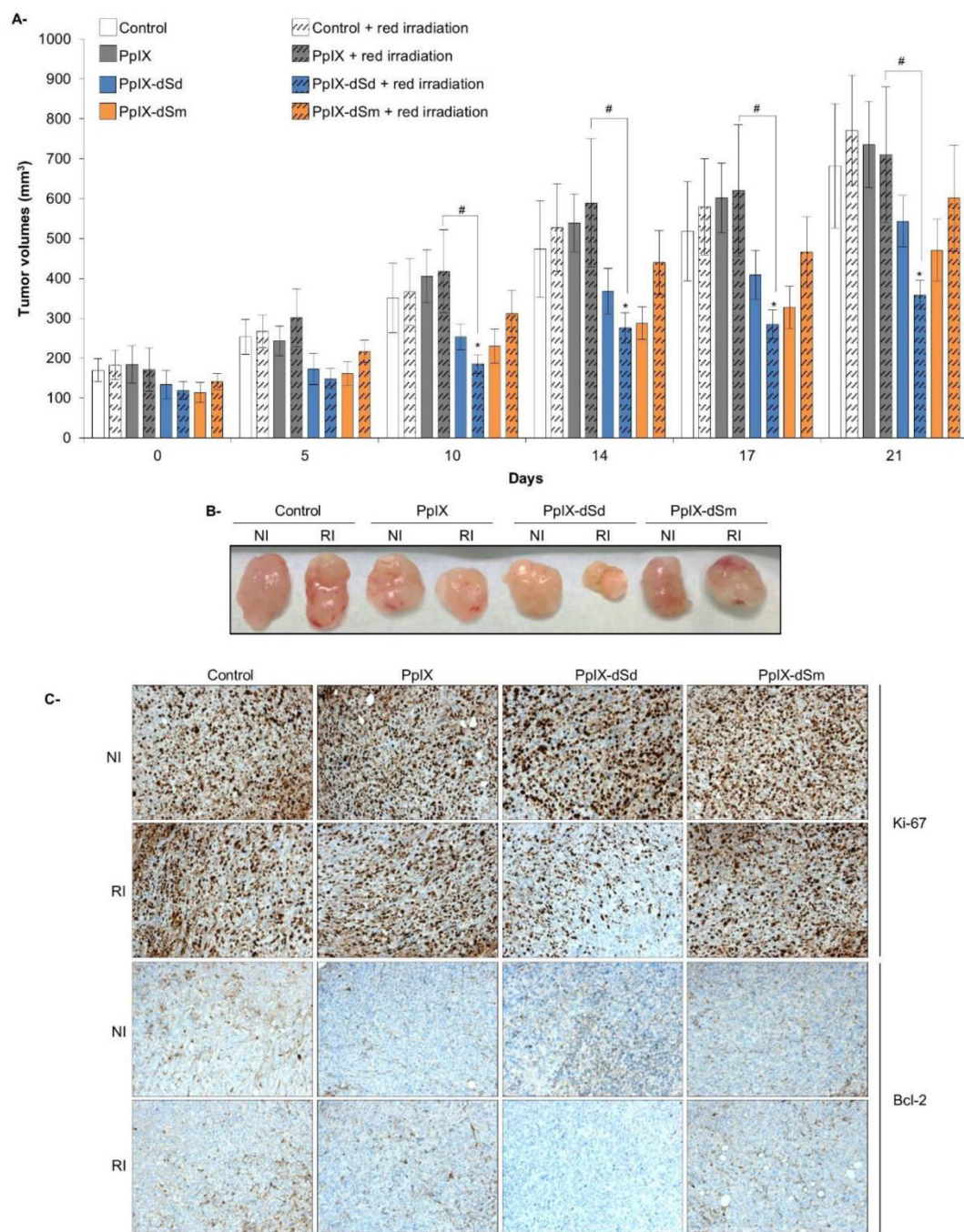


Fig. 11. Effects of PpIX and PpIX-PA on tumor growth *in vivo*. **(A-B)** Each mouse was injected subcutaneously with PC-3 cells in each side of the dorsal region. Mice received injection of 10 mg/kg of PS followed by red irradiation 24 h later only for one tumor by mice. Each group (Control, PpIX, PpIX-dSd and PpIX-dSm) contained 7 mice. At 0–21 days after irradiation, tumor volumes were measured using a caliper. At day 21, mice were sacrificed and tumors were removed for pathological analysis **(C)**. Tumor sections were stained with Ki-67, or subjected to immunohistochemistry detection for Bcl-2. Images were captured under a light microscope (x100). **(2-column image)**



To determine the effects of PS on cell proliferation, histopathological analysis using Ki-67 staining were performed (Fig. 11C). No significant difference were detected between control group and irradiation alone or PS alone groups, suggesting that irradiation alone or PS alone had no effect on cell proliferation. However, in case of photoactivation, PpIX-dSd appeared as the only PS which induced an inhibition of Ki-67 level indicating a reduction of cell proliferation. To determine the PS effect on *in vivo* apoptosis, immunohistochemistry analysis was performed to evaluate the expression level of Bcl-2, an anti-apoptotic protein (Fig. 11C). Bcl-2 seemed to have the same level of expression in all groups compared with control groups, except the PpIX-dSd with irradiation group which presented a lower level of expression. This result suggests an inhibition of this anti-apoptotic pathway, which may lead to apoptosis.

4. Discussion and conclusion

PDT is a minimally invasive treatment procedure, involving a photosensitizer, an optical radiation (usually called “light”) and oxygen. The PDT action is based on light activation of photosensitizer localized in target tissue producing reactive oxygen species which destroy target cells through direct cytotoxicity, vascular shutdown and activation of an immune response.

The development of prostate PDT in particular has accelerated rapidly in past few decades. Some clinical studies of prostate cancer PDT using of transurethral or transperineal irradiation along with photosensitizers or their precursors were conducted. The protocols of these studies are based on the development of new photosensitizers, which, after administration, are preferentially accumulated in parenchymal tumor cells and cause their damage through production of singlet oxygen when activated by irradiation [27].

4.1. Polyamines enhanced PpIX toxicity

Our study provides mechanistic information regarding the effects of PpIX-PA during PDT on human cancer cells. Vectorization of PpIX using polyamines such as spermidine or spermine allows enhancing PpIX efficiency. In 1999, 5-ALA-PDT received approval for the treatment of cancerous lesions. 5-ALA itself is not a PS but leads to production of PpIX, which has photosensitizing properties. 5-ALA-PDT uses PpIX for irradiation with a specific wavelength of visible light [5]. Our lab strategy is to directly use PpIX as PS, without the 5-ALA intermediate, and increase its ability to target tumor tissues by synthesizing PpIX derivatives using polyamines (PA) [4]. PA are involved in cell proliferation and tissue growth [28]. So, facing an important need of PA in cancer cells, PTS is up-regulated and appears as a “Trojan horse” to target cancer cells. This PTS has already been the target of anticancer drug [29].

PpIX-dSd and PpIX-dSm are novel photosensitizers, respectively soluble in DMSO:water (1:1) or water. The fact that spermine contains more amine groups than spermidine justified that PpIX-dSm is



more soluble in water than PpIX-dSd. The spectroscopic data for PpIX-PA indicate that it has the same Q-band absorption as PpIX at approximately 630 nm [30], leading to the use of red light, visible light that penetrates better in tissues [31].

First results about PS toxicity submitted to PpIX-PA indicated that our new PS are more efficient on cell line which more expressed PTS (CHO compared to CHO-MG cells and human prostate cancer cells compared to human prostate non-malignant cells). Furthermore; PS are toxic in CHO-MG even if these cells are PTS-deficient: this is perhaps PS can entry into cells by simple diffusion or non-specific transport because cells are in contact with PS during 24 h without PS removal in *in vitro* experiments.

Also, PpIX-PA derivatives were more efficient compared to PS commonly used as Photofrin® and 5-ALA. Unlike these two PS, PpIX-PA are pure compounds with natural origin and can be used at lower concentration for a same toxic effect. Then, PpIX-PA derivatives were more efficient compared to PpIX alone. In these cell lines, the significance of our *in vitro* study between PpIX and PpIX-PA effects in human prostate cancer cells is very encouraging suggesting that PA seemed to be a good way to target actively growing cells which have up-regulated Polyamine Transport Systems (PTS) as cancer cells. Also, PpIX is a negatively-charged molecule so a poor substrate for simple diffusion and many non-specific transport processes compared to PpIX-PA which are positively-charged molecules thanks to polyamines vectorization. The absence of toxicity without photoactivation and the ability to target cancer cells are the qualities required for a PS. In fact, cell death will be induced only at sites of interest with localized light of optic fiber. So, the use of our new PS in PDT appears as a double targeting strategy: first, targeting by PS and, secondly, by localized irradiation.

The subcellular location of a photosensitizer has a strong influence on whether and to what extent cells undergo apoptosis in response to photoactivation [32]. Most PS bound to mitochondria, lysosomes, ER induced apoptosis by intrinsic pathway; whereas PS bound to plasma membrane kill cells by a non-apoptotic mechanism [33]. Photofrin® has more affinity for plasma membrane and Golgi [34] and can lead to instant ROS formation and subsequent activation of downstream signaling events similar to those elicited by many apoptotic stimuli, but the damage of plasma membranes renders the death phenotype more necrosis like; whereas ALA-induced PpIX is localized at the mitochondria [35] or silicon phthalocyanine (Pc 4) localized to cytosolic membranes, not exclusively in mitochondria [36] induce intrinsic apoptotic pathway. In our experiments, we showed that PpIX is localized in cytoplasm. Also, PA did not alter PpIX localization and cell death induced: PpIX-PA are localized within the cytosol and induced apoptosis by intrinsic pathway, as the majority of PS no localized within the plasma membrane.

4.2. PpIX-PA induced apoptosis and no resistance pathways in prostate cancer cell lines

Since necrotic cell death releases various intracellular substances and induces inflammatory damage to neighboring cells, induction of apoptotic cell death is more appropriate for clinical application. As the



majority of PS [37–40], PpIX-PA induced ROS production leading to apoptosis induction via caspase-dependent mitochondrial pathway as shown by observation of disruption of $\Delta\psi_m$, caspase-9 and caspase-3 activation, PARP-1 inactivation and DNA fragmentation in the three prostate cancer cell lines (**Fig. 12**). Also, PS concentrations used to induce apoptosis in cancer cells had no effect on non-malignant cells, which goes in the direction of conservation of normal tissue surrounding the tumor. Also, regulation of apoptosis is known to be a critical step in carcinogenesis and tumor progression. Several studies have demonstrated a correlation between increase COX-2 expression and inhibition of apoptosis in a variety of cancers as pancreatic, head and neck, colorectal, and prostate cancers [41]. Thus, we decided to study PpIX-PA effects on PC-3 cells which is the most resistant to PDT by PpIX-PA, maybe because is the cell line which have the higher level of COX-2 expression compared to DU 145 and LNCaP cells. In our model, PpIX-PA alone had no effect on COX-2 expression but when they were photoactivated by red light, they induced an increase of COX-2 expression via the p38/MAPK pathway and this is correlated with an increase of PGE₂ production (**Fig. 12**).

In prostate cancer cells, downstream effects of COX-2/PGE₂ pathway on cell viability occur via two potential pathways: by inducing an upregulation of Bcl-2 expression associated with a decrease in apoptosis [42] and also by activating Akt phosphorylation which is independent of Bcl-2 [43]. In PC-3 cell line, in addition to this overexpression of COX-2, we observed an inhibition of Bcl-2 expression, as observed in Pc 4-PDT [44], and an inactivation of Akt (**Fig. 12**). So, in our model, these two pathways did not appear for COX-2 as pathways to resist to apoptosis.

It is well known that COX-2 expression is correlated with the activities of intracellular signaling proteins such as NF- κ B [45]. NF- κ B activation can regulate the expression of cell survival, proliferative, metastatic and angiogenic gene products. We analyzed the PpIX-PA effects on this survival pathway NF- κ B and we observed that PS induced an inhibition of NF- κ B activation and this, only in case of PS photoactivation by red light (**Fig. 12**). Our results clearly indicate for the first time that PpIX-PA exert an inhibition of anti-apoptotic pathways, as Bcl-2, Akt and NF- κ B, in human prostate cancer cells. So, these PS can interfere with a multitude of targets in human prostate cancer cells.

Also, a decrease of COX-2 expression by stable shRNA transfection in PC-3 cells did not induce an increase of DNA fragmentation rate; this result suggested there was not link between COX-2 and apoptosis induced by PpIX-PA in this cell line. Thus, in our model, COX-2/PGE₂ pathway seemed not be involved in apoptosis resistance (**Fig. 12**). COX-2 involvement on PDT efficiency is cell-dependent and photosensitizer-dependent. In fact, its activation is involved in PDT resistance in case of treatment by Photofrin® but not by hypericin. Despite the fact that the chemical structure of our PS is closer Photofrin® than hypericin, the COX-2 pathway mechanisms and its link with apoptosis resistance, directs our model to a mechanism closer to that of hypericin [25]: involvement of p38/MAPK on COX-2



regulation, no involvement in apoptosis resistance. In any case, this effect may be cell-type and PS dependent.

4.3. PpIX-PA effects *in vivo*

On the basis of our experimental results obtained *in vitro*, we carried out PpIX-PA in nude mice. As *in vitro* experiments, we could demonstrate that irradiation alone and PpIX alone had no effect. With PpIX-dSm, non-irradiated tumors are smaller than the irradiated but there was no statistically significant difference. Also, PpIX-dSd caused some dark toxicity: this is perhaps mice were not placed in the dark, they were submitted to a day / night alternation to preserve the biological rhythms, so white light is also capable of inducing PS photoactivation. In case photoactivation by red light, PpIX-dSd appeared as the only efficient PS: tumor cells were photodamaged and tumor growth was reduced, cell proliferation was inhibited and level of anti-apoptotic protein Bcl-2 was reduced. However, our results suggest that PpIX-dSd did not inhibit completely the tumor growth but only slow it. Maybe, PS induced cell tumors death in first days after irradiation, but resistant cells continue to proliferate. When using Photofrin® as PS, it is advised to administer a second laser light treatment 96-120h after the initiation treatment. Therefore, it is possible that multiple light exposures using PpIX-dSd might enhance treatment efficiency. Together, these *in vivo* results suggest that PpIX-dSd is advantageous compared with PpIX. These data were in agreement with our *in vitro* findings. So, the fact that PpIX-dSd does not induce pathways involved in resistance to apoptosis is a good advantage compared to other PS because we do not need a dual therapy to have the maximal effect of our PS.

On the other hand, the PpIX-dSm efficiency observed in *in vitro* experiments was not in *in vivo* experiment. In fact, no significant differences of tumor growth or on cell proliferation were observed. So, in the current conditions, we need to find better conditions to induced apoptosis with this PS. This difference between *in vitro* and *in vivo* results can be explain by permanent contact between PS and cells without PS removal during 24 h in *in vitro* experiments versus PS elimination by mice body in *in vivo* experiments. Some authors [46–49] who work on establishment of anticancer drugs with PA vectors found that spermine conjugates bind tightly to the cell, but no gain entry, which explained their apparent higher affinity for PTS ; whereas spermidine conjugates had lower affinity for the PTS but were more cytotoxic. They reasoned that the increased positive charge of the spermine vectors resulted in tighter binding to others components of the cell membrane, resulting in slowing of their transport. This phenomenon could explain why PpIX-dSm is less efficient than PpIX-dSd in our model.

Also, the most advanced stages of prostate cancer have metastasis, particularly in the bones and lymph nodes. The fact that our PS are no toxic in absence of light and also they do not increase cell viability, demonstrate that PA don't exercise their proliferative effect on cancer cells. So, even if in case of no identified metastasis, our PS do not represent a risk to increase metastasis growth.



From the results of our present study, we conclude that intracellular accumulation and distribution of PpIX are mediated by polyamines which increase potential efficiency and that PpIX-PA exerted its maximal effect without need of dual therapy as the use of COX-2 inhibitors which differs compared to others PS actually used in PDT. We will perform further research to identify the conditions can be applied to PpIX-PA for focal therapy of prostate cancers for which conventional therapies are not recommended or have failed.

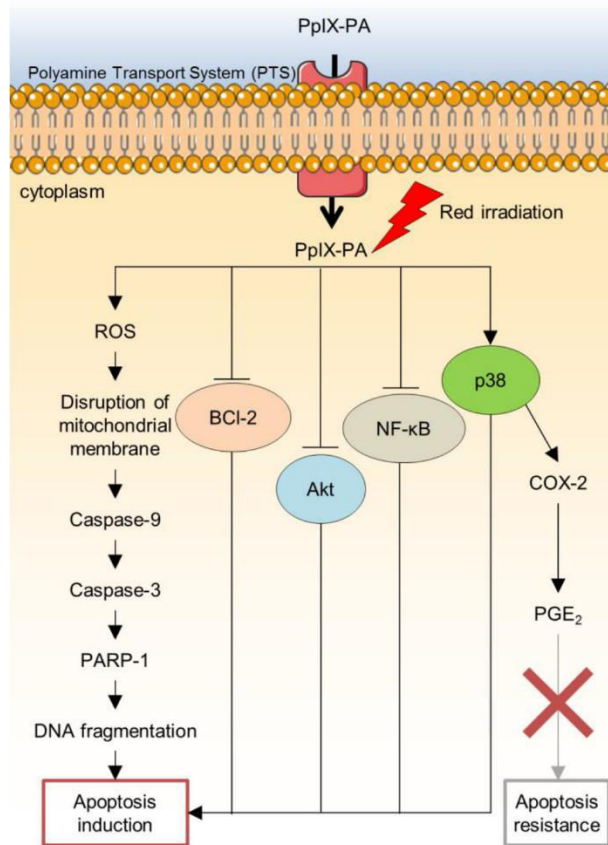


Fig. 12. Effects of PpIX-PA in human prostate cancer cells. PpIX-PA are natural molecules which are synthesized in our research team. Vectorization of PpIX with PA allows targeting cancer cells in comparison to non-malignant cells. Once within the cell, PS are localized in cytoplasm. In case of photoactivation by red light, PS induced ROS production and apoptosis by the intrinsic pathway demonstrated by disruption of mitochondrial membrane, activation of caspase-9 and caspase-3, inactivation of PARP-1 and DNA fragmentation. Signalings known to induce resistance to apoptosis are not activated in our model. In fact, PpIX-PA photoactivated induced an inhibition of Bcl-2 expression, an anti-apoptotic protein, an inhibition of Akt activation, known to be involved in survival cell and an inactivation of Nf-κB, a survival factor. Also, PpIX-PA induced an up-regulation of COX-2/PGE₂ pathway by p38/MAPK but this pathway is not involved in resistance to apoptosis. p38/MAPK activation promoted PDT-induced apoptosis. **(1-column image)**

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.



AUTHORS CONTRIBUTION

RG and VS synthesized and did characterization of PpIX-PA shown in figure 1. CFD performed and analyzed the experiments shown in figure 3 to figure 12 and wrote the paper. CC did acquisitions by confocal microscopy shown in figures 5 and 6. GC and AP provided technical assistance for *in vivo* experiments shown in figures 10-11. DYL performed the experiments shown in figure 2, provided technical assistance for experiments shown in figure 11 and wrote the paper. CYC provided technical assistance for experiments shown in figure 11. BL wrote the paper. All authors approved the final version of the manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professor F. Gaboriau (INSERM U991, Rennes, France) for providing the CHO and CHO-MG cell lines. Authors are grateful to histopathology platform (Histolim - Research Institute GEIST) of the University of Limoges for histopathological staining. The expenses of this work were defrayed in part by the Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie and by the Conseil Régional du Limousin.

REFERENCES

- [1] M.J. Zelefsky, J.A. Eastham, A.M. Cronin, Z. Fuks, Z. Zhang, Y. Yamada, A. Vickers, P.T. Scardino, Metastasis after radical prostatectomy or external beam radiotherapy for patients with clinically localized prostate cancer: a comparison of clinical cohorts adjusted for case mix, *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 28 (2010) 1508–1513.
- [2] M. Triesscheijn, P. Baas, J.H.M. Schellens, F.A. Stewart, Photodynamic Therapy in Oncology, *The Oncologist*. 11 (2006) 1034–1044. doi:10.1634/theoncologist.11-9-1034.
- [3] T.R. Nathan, D.E. Whitelaw, S.C. Chang, W.R. Lees, P.M. Ripley, H. Payne, L. Jones, M.C. Parkinson, M. Emberton, A.R. Gillams, A.R. Mundy, S.G. Bown, Photodynamic therapy for prostate cancer recurrence after radiotherapy: a phase I study, *J. Urol.* 168 (2002) 1427–1432.
- [4] N.V. Koudinova, J.H. Pinthus, A. Brandis, O. Brenner, P. Bendel, J. Ramon, Z. Eshhar, A. Scherz, Y. Salomon, Photodynamic therapy with Pd-Bacteriopheophorbide (TOOKAD): successful *in vivo* treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts, *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*. 104 (2003) 782–789..
- [5] T. Momma, M.R. Hamblin, T. Hasan, Hormonal modulation of the accumulation of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin and phototoxicity in prostate cancer cells, *Int. J. Cancer J. Int. Cancer*. 72 (1997) 1062–1069.
- [6] H. Fukuhara, K. Inoue, A. Kurabayashi, M. Furihata, H. Fujita, K. Utsumi, J. Sasaki, T. Shuin, The inhibition of ferrochelatase enhances 5-aminolevulinic acid-based photodynamic action for prostate cancer, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 10 (2013) 399–409. doi:10.1016/j.pdpdt.2013.03.003.
- [7] K. Soda, The mechanisms by which polyamines accelerate tumor spread, *J. Exp. Clin. Cancer Res. CR.* 30 (2011) 95.
- [8] A.J. Palmer, H.M. Wallace, The polyamine transport system as a target for anticancer drug development, *Amino Acids*. 38 (2010) 415–422.
- [9] V. Sarrazy, G. Garcia, J.P. MBakidi, C.L. Morvan, G. Bégau-Grimaud, R. Granet, V. Sol, P. Krausz, Photodynamic effects of porphyrin-polyamine conjugates in human breast cancer and keratinocyte cell lines, *J. Photochem. Photobiol. B.* 103 (2011) 201–206.



- [10] K. Subbaramaiah, A.J. Dannenberg, Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment, *Trends Pharmacol. Sci.* 24 (2003) 96–102.
- [11] F.A. Sinicrope, S. Gill, Role of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer, *Cancer Metastasis Rev.* 23 (2004) 63–75.
- [12] A. Ristimäki, A. Sivula, J. Lundin, M. Lundin, T. Salminen, C. Haglund, H. Joensuu, J. Isola, Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer, *Cancer Res.* 62 (2002) 632–635.
- [13] S. Gupta, M. Srivastava, N. Ahmad, D.G. Bostwick, H. Mukhtar, Over-expression of cyclooxygenase-2 in human prostate adenocarcinoma, *The Prostate.* 42 (2000) 73–78.
- [14] S. Zha, V. Yegnasubramanian, W.G. Nelson, W.B. Isaacs, A.M. De Marzo, Cyclooxygenases in cancer: progress and perspective, *Cancer Lett.* 215 (2004) 1–20. doi:10.1016/j.canlet.2004.06.014.
- [15] B. Liu, L. Qu, S. Yan, Cyclooxygenase-2 promotes tumor growth and suppresses tumor immunity, *Cancer Cell Int.* 15 (2015) 106.
- [16] C. Sobolewski, C. Cerella, M. Dicato, L. Ghibelli, M. Diederich, The role of cyclooxygenase-2 in cell proliferation and cell death in human malignancies, *Int. J. Cell Biol.* 2010 (2010) 215158.
- [17] M. Luna, A. Ferrario, S. Wong, C.J. Gomer, Identification of MAP kinase pathways involved in COX-2 expression following photofrin photodynamic therapy, *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* 635 (2010) 47–63.
- [18] F. Lamarche, V. Sol, Y.-M. Huang, R. Granet, M. Guilloton, P. Krausz, Synthesis and biological evaluation of polyamine-porphyrin conjugates as potential agents in photodynamic therapy (PDT), *J. Porphyr. Phthalocyanines.* 06 (2002) 130–134.
- [19] B. Ismail, L. Ghezali, R. Gueye, Y. Limami, C. Pouget, D.Y. Leger, F. Martin, J.-L. Beneytout, J.-L. Duroux, M. Diab-Assaf, C. Fagnere, B. Liagre, Novel methylsulfonyl chalcones as potential antiproliferative drugs for human prostate cancer: involvement of the intrinsic pathway of apoptosis, *Int. J. Oncol.* 43 (2013) 1160–1168.
- [20] C. Lepage, D.Y. Léger, J. Bertrand, F. Martin, J.L. Beneytout, B. Liagre, Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells, *Cancer Lett.* 301 (2011) 193–202.
- [21] Y. Limami, A. Pinon, D.Y. Leger, Y. Mousseau, J. Cook-Moreau, J.-L. Beneytout, C. Delage, B. Liagre, A. Simon, HT-29 colorectal cancer cells undergoing apoptosis overexpress COX-2 to delay ursolic acid-induced cell death, *Biochimie.* 93 (2011) 749–757.
- [22] L. Ghezali, D.Y. Leger, Y. Limami, J. Cook-Moreau, J.-L. Beneytout, B. Liagre, Cyclopamine and jervine induce COX-2 overexpression in human erythroleukemia cells but only cyclopamine has a pro-apoptotic effect, *Exp. Cell Res.* 319 (2013) 1043–1053.
- [23] S. Diab, C. Fidanzi, D.Y. Léger, L. Ghezali, M. Millot, F. Martin, R. Azar, F. Esseily, A. Saab, V. Sol, M. Diab-Assaf, B. Liagre, Berberis libanotica extract targets NF-κB/COX-2, PI3K/Akt and mitochondrial/caspase signalling to induce human erythroleukemia cell apoptosis, *Int. J. Oncol.* 47 (2015) 220–230.
- [24] M. Luna, S. Wong, A. Ferrario, C.J. Gomer, Cyclooxygenase-2 expression induced by photofrin photodynamic therapy involves the p38 MAPK pathway, *Photochem. Photobiol.* 84 (2008) 509–514.
- [25] N. Hendrickx, C. Volanti, U. Moens, O.M. Seternes, P. de Witte, J.R. Vandenheede, J. Piette, P. Agostinis, Up-regulation of cyclooxygenase-2 and apoptosis resistance by p38 MAPK in hypericin-mediated photodynamic therapy of human cancer cells, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 52231–52239.
- [26] A. Ferrario, K. Von Tiehl, S. Wong, M. Luna, C.J. Gomer, Cyclooxygenase-2 inhibitor treatment enhances photodynamic therapy-mediated tumor response, *Cancer Res.* 62 (2002) 3956–3961.
- [27] C.M. Moore, D. Pendse, M. Emberton, Photodynamic therapy for prostate cancer--a review of current status and future promise, *Nat. Clin. Pract. Urol.* 6 (2009) 18–30.
- [28] E.W. Gerner, F.L. Meyskens, Polyamines and cancer: old molecules, new understanding, *Nat. Rev. Cancer.* 4 (2004) 781–792.
- [29] J.L. Holley, A. Mather, R.T. Wheelhouse, P.M. Cullis, J.A. Hartley, J.P. Bingham, G.M. Cohen, Targeting of tumor cells and DNA by a chlorambucil-spermidine conjugate, *Cancer Res.* 52 (1992) 4190–4195.



- [30] V. Sol, F. Lamarche, M. Enache, G. Garcia, R. Granet, M. Guilloton, J.C. Blais, P. Krausz, Polyamine conjugates of meso-tritylporphyrin and protoporphyrin IX: potential agents for photodynamic therapy of cancers, *Bioorg. Med. Chem.* 14 (2006) 1364–1377.
- [31] T.S. Mang, Lasers and light sources for PDT: past, present and future, *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 1 (2004) 43–48.
- [32] E. Buytaert, M. Dewaele, P. Agostinis, Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer.* 1776 (2007) 86–107.
- [33] N.L. Oleinick, R.L. Morris, I. Belichenko, The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how, *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.* 1 (2002) 1–21.
- [34] Y.-J. Hsieh, C.-C. Wu, C.-J. Chang, J.-S. Yu, Subcellular localization of Photofrin determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets, *J. Cell. Physiol.* 194 (2003) 363–375.
- [35] B.C. Wilson, M. Olivo, G. Singh, Subcellular localization of Photofrin and aminolevulinic acid and photodynamic cross-resistance in vitro in radiation-induced fibrosarcoma cells sensitive or resistant to photofrin-mediated photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.* 65 (1997) 166–176.
- [36] M. Lam, N.L. Oleinick, A.L. Nieminen, Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 47379–47386.
- [37] X.Y. He, R.A. Sikes, S. Thomsen, L.W. Chung, S.L. Jacques, Photodynamic therapy with photofrin II induces programmed cell death in carcinoma cell lines, *Photochem. Photobiol.* 59 (1994) 468–473.
- [38] B.B. Noodt, K. Berg, T. Stokke, Q. Peng, J.M. Nesland, Apoptosis and necrosis induced with light and 5-aminolaevulinic acid-derived protoporphyrin IX, *Br. J. Cancer.* 74 (1996) 22–29.
- [39] I.E. Kochevar, M.C. Lynch, S. Zhuang, C.R. Lambert, Singlet oxygen, but not oxidizing radicals, induces apoptosis in HL-60 cells, *Photochem. Photobiol.* 72 (2000) 548–553.
- [40] L.Y. Xue, Y. Qiu, J. He, H.J. Kung, N.L. Oleinick, Etk/Bmx, a PH-domain containing tyrosine kinase, protects prostate cancer cells from apoptosis induced by photodynamic therapy or thapsigargin, *Oncogene.* 18 (1999) 3391–3398.
- [41] Y. Limami, A. Pinon, D.Y. Leger, E. Pinault, C. Delage, J.-L. Beneytout, A. Simon, B. Liagre, The P2Y2/Src/p38/COX-2 pathway is involved in the resistance to ursolic acid-induced apoptosis in colorectal and prostate cancer cells, *Biochimie.* 94 (2012) 1754–1763.
- [42] X.H. Liu, S. Yao, A. Kirschenbaum, A.C. Levine, NS398, a selective cyclooxygenase-2 inhibitor, induces apoptosis and down-regulates bcl-2 expression in LNCaP cells, *Cancer Res.* 58 (1998) 4245–4249.
- [43] A.L. Hsu, T.T. Ching, D.S. Wang, X. Song, V.M. Rangnekar, C.S. Chen, The cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib induces apoptosis by blocking Akt activation in human prostate cancer cells independently of Bcl-2, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 11397–11403.
- [44] M. Srivastava, N. Ahmad, S. Gupta, H. Mukhtar, Involvement of Bcl-2 and Bax in photodynamic therapy-mediated apoptosis. Antisense Bcl-2 oligonucleotide sensitizes RIF 1 cells to photodynamic therapy apoptosis, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 15481–15488.
- [45] R.D. Almeida, B.J. Manadas, A.P. Carvalho, C.B. Duarte, Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer.* 1704 (2004) 59–86.
- [46] J.-G. Delcros, S. Tomasi, S. Carrington, B. Martin, J. Renault, I.S. Blagbrough, P. Uriac, Effect of spermine conjugation on the cytotoxicity and cellular transport of acridine, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 5098–5111.
- [47] O. Phanstiel, N. Kaur, J.-G. Delcros, Structure-activity investigations of polyamine-anthracene conjugates and their uptake via the polyamine transporter, *Amino Acids.* 33 (2007) 305–313.
- [48] C. Wang, J.-G. Delcros, J. Biggerstaff, O. Phanstiel, Molecular requirements for targeting the polyamine transport system. Synthesis and biological evaluation of polyamine-anthracene conjugates, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 2672–2682.



- [49] C. Wang, J.-G. Delcros, L. Cannon, F. Konate, H. Carias, J. Biggerstaff, R.A. Gardner, O. Phanstiel IV, Defining the molecular requirements for the selective delivery of polyamine conjugates into cells containing active polyamine transporters, *J. Med. Chem.* 46 (2003) 5129–5138.



RIOU B, POUGET C, **FIDANZI-DUGAS C**, GAMOND A, LAURENT A, SEMAAN J, PINON A, CHAMPAVIER Y, LIAGRE B, DUROUX JL, FAGNERE C, SOL V.

Design and multi-step synthesis of chalcones-polyamine conjugates as potent antiproliferative agents.

Bioorg Med Chem. 2016 (*en soumission*)



Bioorganic & Medicinal Chemistry
journal homepage: www.elsevier.com

Design and multi-step synthesis of chalcone-polyamine conjugates as potent antiproliferative agents

Benjamin Rioux^a, Christelle Pouget^a, Chloë Fidanzi-Dugas^a, Aurélie Gamond^a, Aurélie Laurent^a, Josiane Semaan^a, Aline Pinon^a, Yves Champavier^b, Bertrand Liagre^a, Jean-Luc Duroux^a, Catherine Fagnère^a, Vincent Sol^{a,*}

^aUniversité de Limoges, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, EA 1069, F-87000 Limoges-France

^bUniversité de Limoges, Service Commun de Recherche et d'Analyse de Biomolécules de Limoges (SCRABL), F-87000 Limoges-France

ARTICLE INFO

Article history:

Received

Received in revised form

Accepted

Available online

Keywords:

Chalcones

Polyamines,

Antiproliferative

Prostate cancer cell lines

Colorectal cancer cell lines

ABSTRACT

The aim of this study is to improve bioavailability and selectivity towards cancer cells of 3-hydroxy-3',4,4',5'-tetramethoxychalcone (**1**) and 3',4,4',5'-tetramethoxychalcone (**2**), using polyamine-based vectors. Compounds **1** and **2** were selected as parent chalcones since they were found to be efficient anti-proliferative agents on various cancer cells. A series of ten conjugates was obtained by reacting carboxychalcones with different polyamine tails. Our results outlined the great interest of chalcones **1** and **2** for anticancer activity against two prostatic cancer (PC-3 and DU-145) and two colorectal cancer (HT-29 and HCT-116) cell lines. Then, chalcone-spermine conjugates were shown to be the most active of the series and could be promising compounds for colon and prostatic cancer adjuvant therapy.

2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.



HASSAN L, PINON A, LIMAMI Y, SEMAAN J, FIDANZI-DUGAS C, MARTIN F, BADRAN B, SIMON A, LIAGRE B.

Resistance to ursolic acid-induced apoptosis through involvement of melanogenesis and COX-2/PGE₂ pathways in human M4Beu melanoma cancer cells.

Exp Cell Res. 2016 Jul 1;345(1):60-9

Experimental Cell Research 345 (2016) 60–69



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Experimental Cell Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yexcr



Research Article

Resistance to ursolic acid-induced apoptosis through involvement of melanogenesis and COX-2/PGE₂ pathways in human M4Beu melanoma cancer cells



Lama Hassan^a, Aline Pinon^a, Youness Limami^b, Josiane Seeman^a, Chloe Fidanzi-Dugas^a, Frederique Martin^a, Bassam Badran^c, Alain Simon^a, Bertrand Liagre^{a,*}

^a Laboratory of Chemistry of Natural Substances, Faculty of Pharmacy, University of Limoges, FR 3503 GEIST, EA1069, Limoges, France

^b Laboratoire National de Référence (LNR), Université Mohammed VI des Sciences de la Santé, Casablanca, Morocco

^c Laboratory of Cancer Biology and Molecular Immunology, Faculty of Sciences, Lebanese University, Beirut, Lebanon

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 December 2015

Received in revised form

27 May 2016

Accepted 28 May 2016

Available online 1 June 2016

Keywords:

Ursolic acid

Melanogenesis

COX-2

Melanoma cancer cells

Apoptosis

Survival pathways

ABSTRACT

Melanoma is one of the most aggressive forms of cancer with a continuously growing incidence worldwide and is usually resistant to chemotherapy agents, which is due in part to a strong resistance to apoptosis. Previously, we had showed that B16-F0 murine melanoma cells undergoing apoptosis are able to delay their own death induced by ursolic acid (UA), a natural pentacyclic triterpenoid compound. We had demonstrated that tyrosinase and TRP-1 up-regulation in apoptotic cells and the subsequent production of melanin were implicated in an apoptosis resistance mechanism. Several resistance mechanisms to apoptosis have been characterized in melanoma such as hyperactivation of DNA repair mechanisms, drug efflux systems, and reinforcement of survival signals (PI3K/Akt, NF-κB and Raf/MAPK pathways). Otherwise, other mechanisms of apoptosis resistance involving different proteins, such as cyclooxygenase-2 (COX-2), have been described in many cancer types. By using a strategy of specific inhibition of each ways, we suggested that there was an interaction between melanogenesis and COX-2/PGE₂ pathway. This was characterized by analyzing the COX-2 expression and activity, the expression of tyrosinase and melanin production. Furthermore, we showed that anti-proliferative and proapoptotic effects of UA were mediated through modulation of multiple signaling pathways including Akt and ERK-1/2 proteins. Our study not only uncovers underlying molecular mechanisms of UA action in human melanoma cancer cells but also suggest its great potential as an adjuvant in treatment and cancer prevention.

© 2016 Elsevier Inc. All rights reserved.



NDONG NTOUTOUME GM, GRANET R, MBAKIDI JP, BRÉGIER F, LÉGER DY, FIDANZI-DUGAS C, LEQUART V, JOLY N, LIAGRE B, CHALEIX V, SOL V.

Development of curcumin-cyclodextrin/cellulose nanocrystals complexes: New anticancer drug delivery systems.

Bioorg Med Chem Lett. 2016 Feb 1;26(3):941-5.

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 26 (2016) 941–945



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmcl



Development of curcumin–cyclodextrin/cellulose nanocrystals complexes: New anticancer drug delivery systems



Gautier M. A. Ndong Ntoutoume^a, Robert Granet^a, Jean Pierre Mbakidi^a, Frédérique Brégier^a, David Y. Léger^a, Chloë Fidanzi-Dugas^a, Vincent Lequart^b, Nicolas Joly^b, Bertrand Liagre^a, Vincent Chaleix^a, Vincent Sol^{a,*}

^a Université de Limoges, Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles, EA 1069, F-87000 Limoges, France

^b Université d'Artois, IUT de Béthune, 1230 rue de l'Université, 62408 Béthune Cedex, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 November 2015

Revised 16 December 2015

Accepted 17 December 2015

Available online 18 December 2015

Keywords:

Cellulose nanocrystals

Nanoparticles

Curcumin

Drug delivery

Cancer cells

ABSTRACT

The synthesis of curcumin–cyclodextrin/cellulose nanocrystals (CNCx) nano complexes was performed. CNCx were functionalized by ionic association with cationic β -cyclodextrin (CD) and CD/CNCx complexes were used to encapsulate curcumin. Preliminary in vitro results showed that the resulting curcumin–CD/CNCx complexes exerted antiproliferative effect on colorectal and prostatic cancer cell lines, with IC_{50} s lower than that of curcumin alone.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.



DIAB S, FIDANZI C, LEGER DY, GHEZALI L, MILLOT M, MARTIN F, AZAR R, ESSEILY F, SAAB A, SOL V, DIAB-ASSAF MONA, LIAGRE B.

Berberis libanotica extract targets NF- κ B/COX-2, PI3K/Akt and mitochondrial/caspase signalling to induce human erythroleukemia cell apoptosis.

Int J Oncol. 2015 Jul;47(1):220-30

INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY 47: 220-230, 2015

Berberis libanotica extract targets NF- κ B/COX-2, PI3K/Akt and mitochondrial/caspase signalling to induce human erythroleukemia cell apoptosis

SAADA DIAB¹, CHLOE FIDANZI¹, DAVID Y. LÉGER¹, LAMIA GHEZALI¹, MARION MILLOT¹,
FRÉDÉRIQUE MARTIN¹, RANIA AZAR², FADI ESSEILY³, ANTOINE SAAB⁴,
VINCENT SOL¹, MONA DIAB-ASSAF² and BERTRAND LIAGRE¹

¹Laboratory of Chemistry of Natural Substances, Faculty of Pharmacy, University of Limoges, FR 3503 GEIST, EA1069, Limoges, France; ²Molecular Tumorigenesis and Anticancer Pharmacology, EDST, Lebanese University, Hadath;

³Laboratory Science Department, Faculty of Public Health, Lebanese University, Jdeidet El Metn;

⁴Faculty of Sciences II, Chemistry Department, Lebanese University, Beirut, Lebanon

Received March 10, 2015; Accepted April 7, 2015

DOI: 10.3892/ijo.2015.3012

Abstract. The aim of this study was to describe and understand the relationship between cyclooxygenase-2 (COX-2) expression and apoptosis rate in erythroleukemia cells after apoptosis induction by *Berberis libanotica* (Bl) extract. To achieve this goal we used erythroleukemia cell lines expressing COX-2 (HEL cell line) or not (K562 cell line). Moreover, we made use of COX-2 cDNA to overexpress COX-2 in K562 cells. In light of the reported chemopreventive and chemosensitive effects of natural products on various tumor cells and animal models, we postulated that our Bl extract may mediate their effects through apoptosis induction with suppression of cell survival pathways. Our study is the first report on the specific examination of intrinsic apoptosis and Akt/NF- κ B/COX-2 pathways in human erythroleukemia cells upon Bl extract exposure. Even if Bl extract induced apoptosis of three human erythroleukemia cell lines, a dominant effect of Bl extract treatment on K562 cells was observed resulting in activation of the late markers of apoptosis with caspase-3 activation, PARP cleavage and DNA fragmentation. Whereas, we showed that Bl extract reduced significantly expression of COX-2 by a dose-dependent manner in HEL and K562 (COX-2⁺) cells. Furthermore, in regard to our results, it is clear that the simultaneous inhibition of Akt and NF- κ B signalling can significantly contribute to the anticancer effects of Bl extract in human erythroleukemia cells. We observed that

the Bl extract is clearly more active than the berberine alone on the induction of DNA fragmentation in human erythroleukemia cells.

Correspondence to: Professor Bertrand Liagre, Laboratory of Chemistry of Natural Substances, Faculty of Pharmacy, University of Limoges, FR 3503 GEIST, EA1069, Limoges, France
E-mail: bertrand.liagre@unilim.fr

Key words: *Berberis libanotica*, COX-2, NF- κ B, PI3K/Akt, apoptosis, erythroleukemia cells



ISMAIL B, FAGNERE C, LIMAMI Y, GHEZALI L, POUGET C, **FIDANZI C**, OUK C, GUEYE R, BENEYTOU JL, DUROUX JL, DIAB-ASSAF M, LEGER DY, LIAGRE B.

2'-Hydroxy-4-methylsulfonylchalcone enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells.

Anticancer Drugs. 2015 Jan;26(1):74-84.

2'-Hydroxy-4-methylsulfonylchalcone enhances TRAIL-induced apoptosis in prostate cancer cells

Bassel Ismail^a, Catherine Fagnere^b, Youness Limami^a, Lamia Ghezali^a, Christelle Pouget^b, Chloë Fidanzi^a, Catherine Ouk^d, Rokhaya Gueye^b, Jean-Louis Beneytout^a, Jean-Luc Duroux^c, Mona Diab-Assaf^e, David Y. Leger^a and Bertrand Liagre^a

Prostate cancer is the most common malignant cancer in men and the second leading cause of cancer deaths.

Previously, we have shown that 2'-hydroxy-4-methylsulfonylchalcone (RG003) induced apoptosis in prostate cancer cell lines PC-3 and DU145. Although tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is a promising anticancer agent, some cancer cells are resistant to TRAIL treatment. PC-3 and LNCaP prostatic cancer cell lines have been reported to be resistant to TRAIL-induced apoptosis. Here, we show for the first time that RG003 overcomes TRAIL resistance in prostate cancer cells. RG003 can enhance TRAIL-induced apoptosis through DR5 upregulation and downregulation of Bcl-2, PI3K/Akt, NF- κ B, and cyclooxygenase-2 (COX-2) survival pathways. When used in combined treatment, RG003 and TRAIL amplified TRAIL-induced activation of apoptosis effectors and particularly activation of caspase-8 and the executioner caspase-3, leading to increased poly-ADP-ribose polymerase cleavage and DNA fragmentation in prostate cancer cells. Furthermore, we showed that RG003 reduced COX-2 expression in cells. Previously, we showed that COX-2 was involved in resistance to an apoptosis mechanism; then, its inhibition by RG003 could render cells

more sensitive to TRAIL treatment. We showed that nuclear factor- κ B activation was inhibited after RG003 treatment.

This inhibition was correlated with reduction in COX-2 expression and induction of apoptosis. Overall, we conclude, for the first time, that RG003 can enhance TRAIL-induced apoptosis in human prostate cancer cells. The significance of our in-vitro study with RG003 and TRAIL combined is very encouraging, suggesting the relevance of testing this combined treatment in xenograft animal models. *Anti-Cancer Drugs* 00:000-000 © 2014 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

Anti-Cancer Drugs 2014, 00:000-000

Keywords: apoptosis, chalcone, DR5, PI3K/Akt, prostate cancer cells, TRAIL

^aBiochemistry and Molecular Biology Laboratory, ^bOrganic Chemistry and Therapeutic Laboratory, ^cBiophysical Laboratory, Faculty of Pharmacy, University of Limoges, FR 3503 GEIST, EA1069, GDR CNRS 3049, ^dPlate-forme CIM, University of Limoges, Limoges, France and ^eBiochemistry Department, Faculty of Science – Section II, Lebanese University, TM-PAC Team, Jdeidet, Lebanon

Correspondence to Bertrand Liagre, PhD, LCSN EA1069, GDR CNRS 3049, Faculty of Pharmacy, Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology, Street 2 of Doctor Marcland, 87025 Limoges Cedex, France
Tel: +33 555 43 58 39; fax: +33 555 43 58 01; e-mail: bertrand.liagre@unilim.fr

Received 20 February 2014 Revised form accepted 29 July 2014



Utilisation de nouveaux photosensibilisateurs pour le traitement du cancer de la prostate par photothérapie dynamique : étude *in vitro* et *in vivo*.

Le cancer de la prostate est le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez l'homme de plus de 50 ans dans les pays industrialisés. L'importance accordée à la qualité de vie des patients conduit la recherche médicale à développer des méthodes de thérapie focale afin de traiter ce type de cancer de manière conservatrice et non plus de manière radicale. Dans cette optique, la photothérapie dynamique (PDT) repose sur l'utilisation de photosensibilisateurs (PS) capables de cibler spécifiquement les cellules cancéreuses et qui, une fois activés par la lumière, vont induire la mort de ces cellules. Sur la base de la chimie verte, le Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) de Limoges a développé une stratégie de couplage de la protoporphyrine IX (PpIX), un PS largement étudié, avec des polyamines (PA). Les effets de ces nouveaux PS [la protoporphyrine IX dispermidinée (PpIX-dSd) et la protoporphyrine IX disperminée (PpIX-dSm)] ont été étudiés sur les cellules cancéreuses prostatiques humaines PC-3, DU 145 et LNCaP. Ce travail a permis de démontrer que ces deux PS répondent aux critères attendus d'un PS : une composition pure, une absence de toxicité en absence de lumière et une sélectivité vis-à-vis des cellules tumorales. De plus, ces PS induisent l'apoptose de ces cellules via la voie intrinsèque. Aussi les voies de résistance à l'apoptose ont été étudiées : les PS induisent une inhibition d'Akt, de Bcl-2, de NF- κ B et de la voie autophagique et activent la voie p38/COX-2/PGE₂ qui ne semble pas être impliquée dans un mécanisme de résistance à l'apoptose dans ce modèle d'étude. Enfin, l'efficacité de ces PS, et notamment de la PpIX-dSd, a été mise en évidence *in vivo*, à l'aide de xénogreffes sous-cutanées de cellules PC-3 effectuées sur des souris nudes. Ainsi, ces dérivés de PpIX-PA apparaissent comme de bons candidats dans le cadre du traitement du cancer de la prostate par PDT.

Mots-clés : cancer de la prostate, photothérapie dynamique, apoptose, cyclooxygénase, autophagie.

New photosensitizers use for prostate cancer treatment by photodynamic therapy: *in vitro* and *in vivo* study.

Prostate cancer is the most frequently diagnosed cancer among men aged 50 years and older in industrialized countries. Medical research developed methods of focal therapy to treat this type of cancer conservatively and not radically in order to improve the patients quality of life. With this in mind, photodynamic therapy (PDT) is based on the use of photosensitizers (PS) able to specifically target cancer cells and, once activated by light, induce cell death. Based on Green Chemistry, the Laboratoire de Chimie des Substances Naturelles (LCSN) from Limoges developed new PS: protoporphyrin IX, a PS widely studied, vectorized with polyamines (PA). The effects of spermidine-linked protoporphyrin IX (PpIX-dSd) and spermine-linked protoporphyrin IX (PpIX-dSm) were studied on human prostate cancer cells PC-3, DU145 and LNCaP. This study demonstrated that both PS have the expected ideal properties: a pure composition, no toxicity in dark and ability to specifically target tumor cells. Moreover, PpIX-PA induced apoptotic intrinsic pathway. In addition, pathways involved in apoptosis resistance were studied: PS inhibited Bcl-2, Akt, NF- κ B and autophagy but activated p38/COX-2/PGE₂ pathway which was not involved in apoptosis resistance in our model. Finally, *in vivo* experiments showed PpIX-PA efficiency using subcutaneous xenograft of PC-3 cells performed on nude mice. Thus, these derivatives of PpIX-PA appear to be good candidates in prostate cancer treatment by PDT.

Keywords: prostate cancer, photodynamic therapy, apoptosis, cyclooxygenase, autophagy.

