

Introduction à la thérapie photodynamique (PDT).

I. Introduction

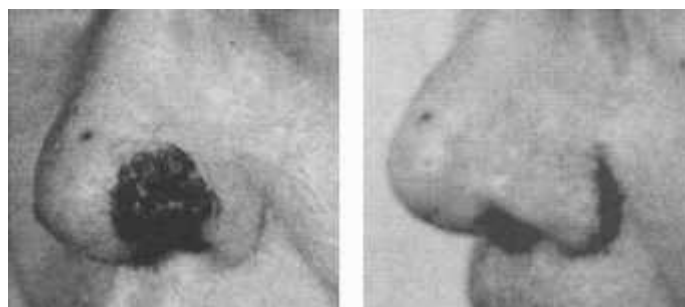
Il s'agit d'une voie de traitement de certains types de cancer qui peut être employée soit en complément soit en remplacement d'une autre méthode telle que la chirurgie.

Le cancer est une maladie due à la prolifération anarchique de cellules qui se multiplient indéfiniment. Ces cellules sont capables d'envahir le tissu normal avoisinant, de le détruire puis de migrer et coloniser d'autres tissus – on parle alors de métastases. La prolifération est rendue possible, entre autres, par le fait que les cellules cancéreuses ne répondent plus au signal d'autodestruction (les facteurs pro-apoptotiques), reçu par la cellule par des « récepteurs de mort ».

Les traitements classiques du cancer : sont la chirurgie qui consiste à retirer les parties du corps envahies par les tumeurs ; la radiothérapie qui utilise les rayonnements ionisants émis par certains éléments radioactifs pour détruire les cellules anormales ou du moins ralentir leur progression ; et la chimiothérapie qui implique l'utilisation de produits chimiques ayant un effet direct sur les cellules malades, soit en les détruisant, soit en empêchant leur prolifération.

Malgré leur efficacité, toutes ces techniques présentent de nombreux inconvénients : la chirurgie est en générale trop invalidante pour le malade (même si des progrès sont faits pour diminuer la gêne occasionnée), tandis que la radiothérapie et la chimiothérapie manquent de sélectivité et touchent également les tissus sains.

Puisque le cancer est la deuxième cause de mortalité chez l'homme (après les maladies cardiovasculaires), on comprend l'intérêt de la thérapie photodynamique (PDT). Il s'agit en effet d'une technique innovante qui a été récemment acceptée en clinique pour traiter un certain nombre de cancers et ne présentant pas tous les inconvénients des autres traitements.



**Fig. 1 : carcinome basocellulaire de la base du nez avant et après 1 mois de traitement PDT.
On notera la quasi-absence de cicatrice.**

Elle est basée sur la combinaison de deux facteurs : une molécule photosensibilisante qui n'est pas toxique par elle-même et une source lumineuse. Cette molécule est capable d'absorber un photon, entraînant par la suite une série de réactions causant des dommages irréversibles aux tissus concernés.

II. La thérapie photodynamique

1. Historique

Les effets thérapeutiques de la lumière sont connus depuis l'Antiquité. Les Egyptiens l'utilisaient déjà combinée à des substances naturelles pour traiter des maladies de peau.

Le concept de photosensibilisation apparaît en 1898 quand Oscar Raab décrit pour la première fois le phénomène phototoxique : l'association d'un colorant (l'acridine) et de lumière (les deux éléments pris séparément n'ayant pas d'action) entraîne la mort d'organismes vivants : les paramécies.

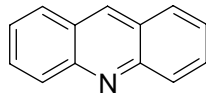


Fig. 2 : acridine

En 1903, Jesionek et von Tappeiner (alors professeur de Raab), traitent un cancer cutané par application topique d'éosine suivie d'une exposition à la lumière blanche. En 1904, Tappeiner suppose que l'oxygène est essentiel pour le processus et introduit le terme « d'action photodynamique ».

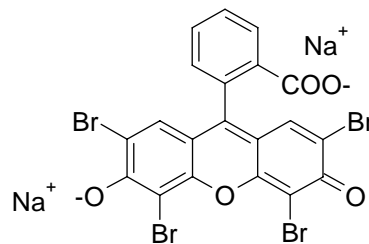


Fig. 3 : éosine Y

Cette supposition sera confirmée en 1909 par Hasselbach qui rédigera le premier rapport sur le caractère phototoxique de l'hématoporphyrine Hp (l'un des constituants du sang) en travaillant sur des souris.

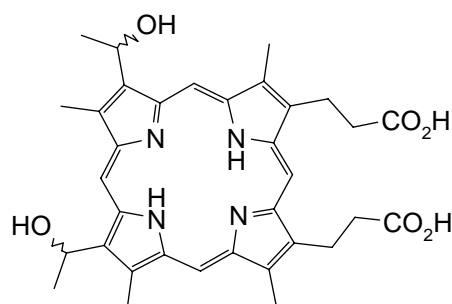


Fig. 4 : l'hématoporphyrine

Afin de prouver que les résultats de phototoxicité mis en évidence chez la souris peuvent s'appliquer à l'homme, Friedrich Meyer-Betz se livre en 1912 à une expérience sur lui-même en s'injectant 200 mg d'hématoporphyrine. Tant qu'il est resté non exposé au soleil, rien de spectaculaire ne se produisit, mais lors de l'exposition à la lumière solaire, une

réaction eut lieu, entraînant une hyperpigmentation de la peau et un œdème généralisé ; symptômes d'une hypersensibilité à la lumière dont il souffrira pendant plusieurs semaines.

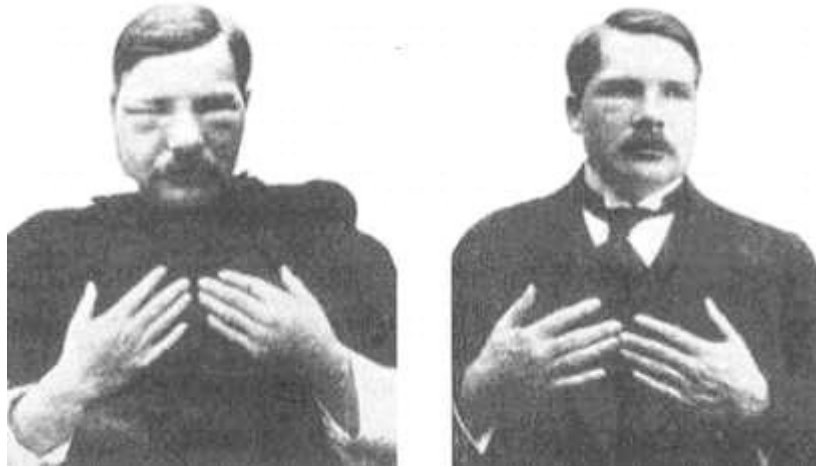


Fig. 5 : Meyer-Betz. A droite : après injection et exposition au soleil. A gauche : cinq jours après injection, l'œdème est réduit, mais quelques lésions sur les mains et le visage subsistent.

En 1924, Policard met en évidence la fluorescence spontanée de tumeurs exposées à la lumière ultraviolette ; phénomène interprété comme étant dû à l'accumulation de l'hématoporphyrine endogène (biosynthétisée par le corps) dans les cellules tumorales.

En 1942, Auler et Banzer, s'appuyant sur les travaux de Policard découvrent les propriétés sensibilisatrices de l'hématoporphyrine.

Puis en 1948 Figge confirme l'affinité de cette substance pour les tissus tumoraux et suggère la possibilité d'utiliser l'hématoporphyrine pour localiser les zones tumorales chez l'homme.

En 1955, une série d'expériences réalisées par Schwartz prouve que l'hématoporphyrine commerciale n'est pas un produit pur et tente de la purifier. Il constate que le produit pur est moins sélectif au niveau tumoral que le produit commercial.

En 1961, Lipson propose de purifier l'hématoporphyrine par un lavage avec un mélange d'acide acétique et d'acide sulfurique. Le produit obtenu, appelé HpD pour « Hematoporphyrin Derivative » sera utilisé pour traiter des patients atteints de tumeurs cancéreuses du poumon.

Dans les années soixante dix, Dougherty utilise avec succès l'HpD couplée à une lampe à arc à xénon pour soigner des tumeurs mammaires implantées chez la souris. Puis en 1976 il réalise les premiers essais chez l'homme qui donnent des résultats encourageants. Toujours pionnier dans ce domaine, il remplacera par la suite la lampe à arc par le laser qui permet d'irradier sélectivement la zone à traiter. Entre 1983 et 1985, il identifie les fractions actives de l'HpD conférant les propriétés photosensibilisantes au mélange initial (l'éther et l'ester de dihématoporphyrine).

En 1985 une fraction enrichie en composés les plus actifs de l'HpD est commercialisée sous l'appellation **Photofrin II®**.

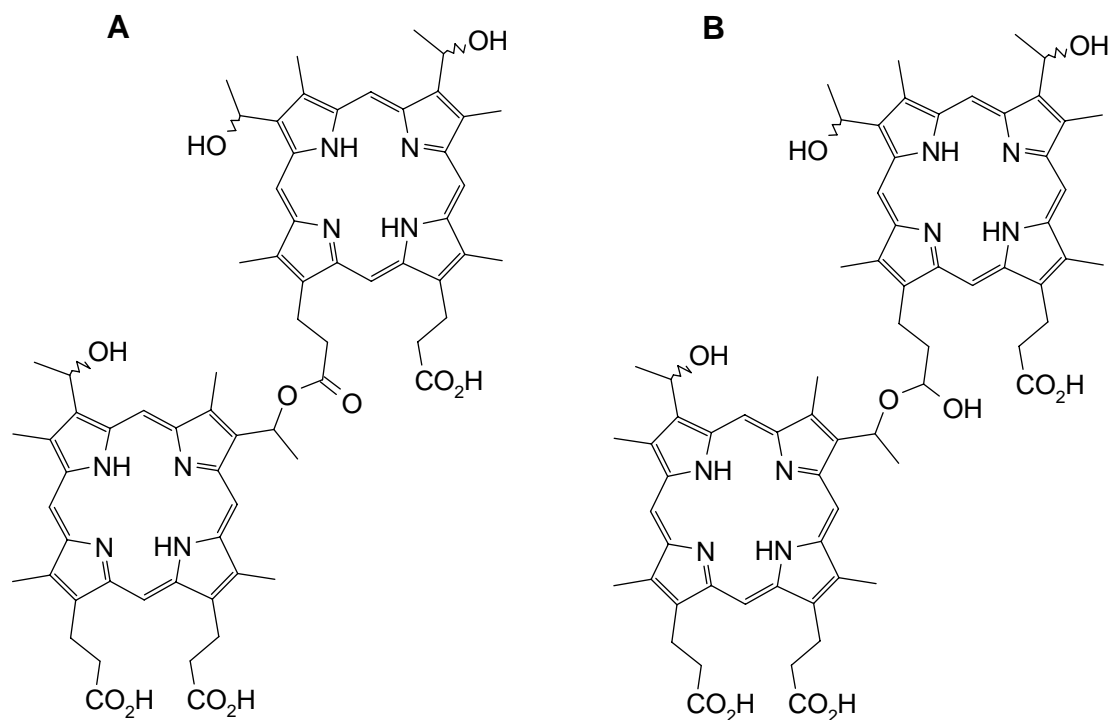


Fig. 6 : A) ester de dihématoporphyrine ; B) éther de dihématoporphyrine (DHE)

Entre 1986 et 2000, le **Photofrin®** sera le seul photosensibilisateur utilisé en clinique humaine. Il n'a reçu que récemment l'autorisation de mise sur le marché dans plusieurs pays (USA, France, Hollande, Japon...).

Désormais, de nouvelles molécules, plus spécifiques et plus actives sont développées en laboratoire. Certaines ont reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) tandis que d'autres sont actuellement en essai phase clinique I, II ou III.

2. Définition

La thérapie photodynamique (PDT pour PhotoDynamic Therapy) antitumorale est une technique de traitement basée sur l'association de molécules photosensibilisantes (Ps) capables de se concentrer dans les cellules tumorales, et d'une lumière focalisée de longueur d'onde appropriée (dépendante du Ps). Ce sera la combinaison de ces deux facteurs qui permettra de cibler spécifiquement les tissus tumoraux et de les détruire.

Cette méthode présente tout de même un inconvénient de taille : seuls les cancers accessibles à la lumière peuvent être traités (la lumière rouge par exemple n'a qu'une pénétration d'environ 1 cm dans les tissus vivants).

3. Principe et mécanisme

L'action de la lumière (à une longueur d'onde soigneusement sélectionnée) sur le sensibilisateur va entraîner la formation d'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ (de courte durée de vie : environ 0.01- 0.004 μs), molécule très réactive vis-à-vis des composants cellulaires et donc très toxique.

Le photosensibilisateur est injecté par voie intraveineuse ; Celui-ci va se concentrer plus ou moins sélectivement dans le tissu tumoral dont l'irradiation par une lumière laser de

longueur d'onde appropriée au colorant utilisé conduit à la nécrose ou l'apoptose des cellules cancéreuses.

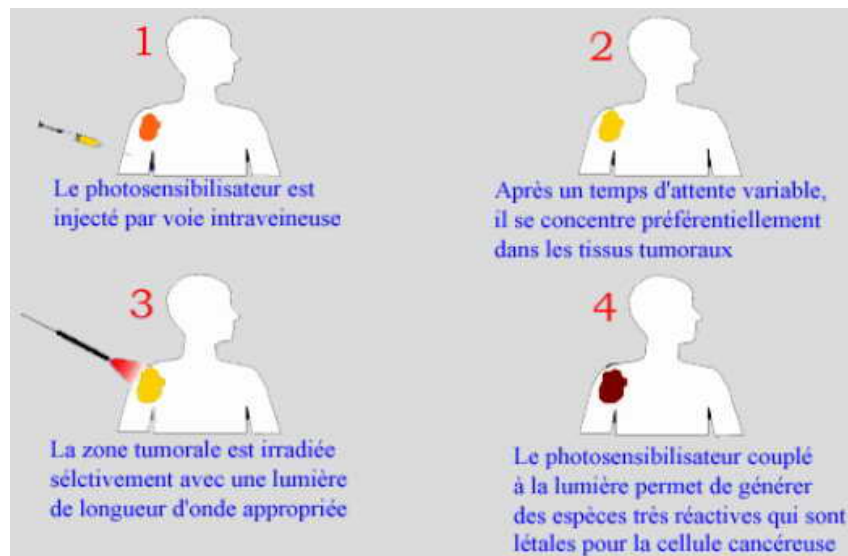


Fig. 7 : protocole clinique de la PDT

a) Nature de l'oxygène singulet.

Il convient d'expliciter dès maintenant ce qu'est l'oxygène singulet : il s'agit d'une forme d'oxygène, de plus haute énergie que l'oxygène classique, formée par excitation de ce dernier.

Penchons-nous quelques instants sur le diagramme d'orbitales moléculaires de l'oxygène obtenu par la méthode LCAO (Linear Combination of Atomic Orbitals) :

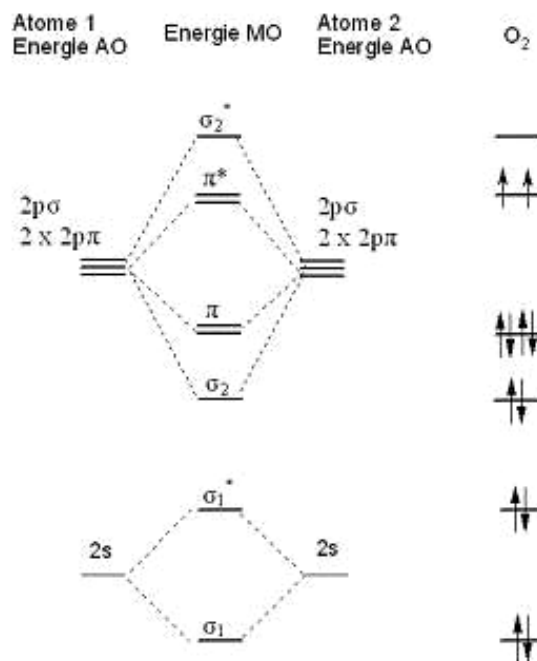
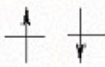




Fig. 8

L'oxygène est un cas un peu particulier puisqu'il présente deux électrons non appariés présent sur deux orbitales de même énergie.

Les trois premiers niveaux électroniques de l'oxygène sont les suivants :

Etat	Nom commun	Energie (kJ.mol ⁻¹)	Durée de vie en phase condensée	Configuration électronique de l'HOMO
¹ Σ _g ⁺		155	< 10 ⁻⁹ s	
¹ Δ _g	Oxygène singulet ¹ O ₂	94	~ 10 μs	
¹ Σ _g ⁻	Oxygène ³ O ₂	0	∞	

HOMO : orbitale moléculaire occupée de plus haute énergie

Lors de l'excitation de l'oxygène moléculaire, ce dernier peut être dans deux états de plus haute énergie : le premier, désigné ¹Σ_g⁺, a une durée de vie extrêmement courte et se désexcite rapidement dans le second état de plus basse énergie, désigné ¹Δ_g d'une durée de vie de quelques microsecondes en phase condensée.

A noter que la durée de vie de cet état varie en fonction du solvant :

Solvant	H ₂ O	MeOH	C ₆ H ₆	CS ₂	CCl ₄	C ₆ F ₆	D ₂ O	[Air, 1 atm.]
τ (μs)	2	7	24	200	700	3900	20	~ 76000

τ : durée de vie

C'est cet état de l'oxygène, alors appelé oxygène singulet qui est responsable de la destruction des tissus tumoraux en PDT.

b) Processus photochimique

Il s'agit ici d'expliquer la formation d'oxygène singulet ¹O₂ à partir d'oxygène par l'action conjuguée de la lumière et du sensibilisateur.

Lorsqu'une substance absorbe de l'énergie ; par exemple lorsqu'on l'illumine, il en résulte un état d'énergie supérieur (un état excité) qui est instable et les molécules vont retourner à leur état initial en relarguant l'énergie selon différents processus :

- transfert de l'énergie excédentaire à une autre molécule par collision (en solution),
- conversion de l'énergie excédentaire en énergie thermique,
- émission d'un photon lumineux selon deux aspects illustrés par le diagramme de Jablonski.

Le diagramme de Jablonski peut être appliqué plus spécifiquement à la PDT en montrant les mécanismes d'excitation et désexcitation des états électroniques des photosensibilisateurs :

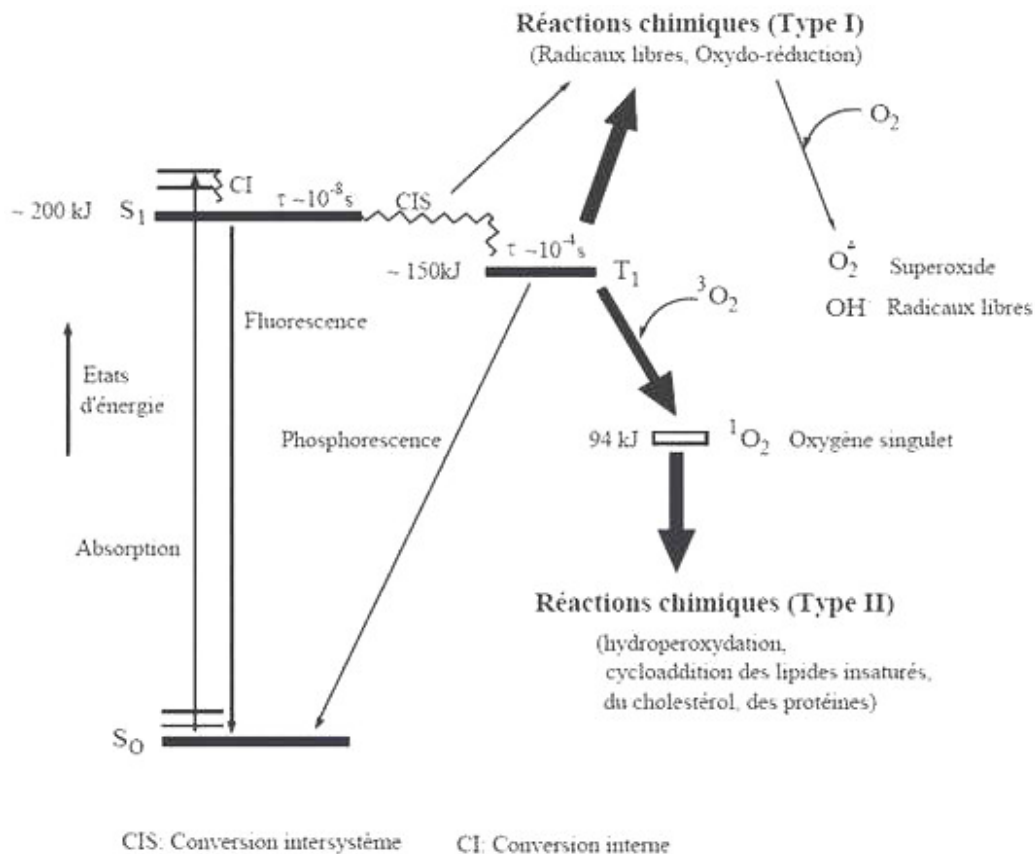


Fig. 9 : diagramme de Jablonski

Après absorption de lumière, les photosensibilisateurs provoquent l'excitation de molécules normalement insensibles.

Lors de l'absorption de lumière (phénomène très rapide $\sim 10^{-15}$ s), le photosensibilisateur passe de son état singulet fondamental S_0 à différents états singulets (S_1, S_2, \dots, S_n). Il y a ensuite retour à l'état singulet excité de plus basse énergie S_1 par deux phénomènes : la relaxation vibrationnelle (IVR) et la conversion interne (IC). A partir de cet état S_1 (de courte durée de vie 10^{-10} à 10^{-7} s), le retour à l'état initial S_0 peut s'opérer de deux façons :

- par émission d'un photon par fluorescence,
- par transfert de l'énergie à un état triplet T_1 par conversion intersystème (ISC).

Le retour à S_0 à partir de T_1 peut ensuite s'effectuer par émission de phosphorescence. Cependant, la durée de vie de cet état triplet (de 10^{-6} à 1 s), relativement longue, permet à la molécule d'interagir avec les substrats situés dans son environnement proche (par exemple l'oxygène). Deux types de réactions sont alors possibles :

+ Photoréaction de type I :

L'état triplet T_1 réagit directement avec des substrats biologiques par transfert d'électrons ou d'atomes d'hydrogène conduisant à la formation d'espèces radicalaires. Les radicaux libres peuvent réagir avec l'oxygène dans son état fondamental pour former l'ion superoxyde $O_2^{\cdot-}$. Si cette espèce n'est pas particulièrement réactive, sa forme protonée peut en revanche être transformée en peroxyde d'hydrogène plus actif selon :

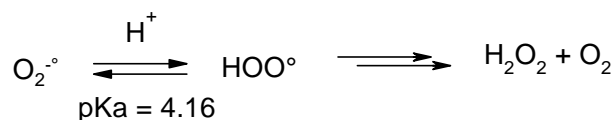


Fig. 10

+ Photoréaction de type II :

L'état triplet T_1 réagit directement avec l'oxygène en lui transférant son excès d'énergie, qui fait passer l'oxygène $^3\text{O}_2$ à son état singulet $^1\text{O}_2$.

L'ensemble de ces processus entraîne la dégradation d'un grand nombre de constituants cellulaires conduisant à la mort cellulaire par nécrose ou plus souvent par apoptose. La compétition entre ces deux mécanismes est contrôlée par plusieurs paramètres tels la nature du sensibilisateur et la concentration en oxygène. Des études ont montrées que le mécanisme de type II est prédominant en PDT des porphyrines.

A noter que l'oxygène singulet formé peut réagir avec le Ps et le détruire par ouverture du macrocyle. Cette dégradation, appelée photobleaching est une conséquence des réactions de type I et II.

c) Le rôle de l'oxygène singulet en PDT

L'oxygène singulet $^1\text{O}_2$, formé par l'action combinée d'un photosensibilisateur, de lumière et d'oxygène, est un puissant oxydant qui réagit avec de nombreux constituants cellulaires tels les triacycles glycérols saturés, le cholestérol des membranes, les phospholipides, les acides aminés (histidine, tryptophane, méthionine) et les acides nucléiques :

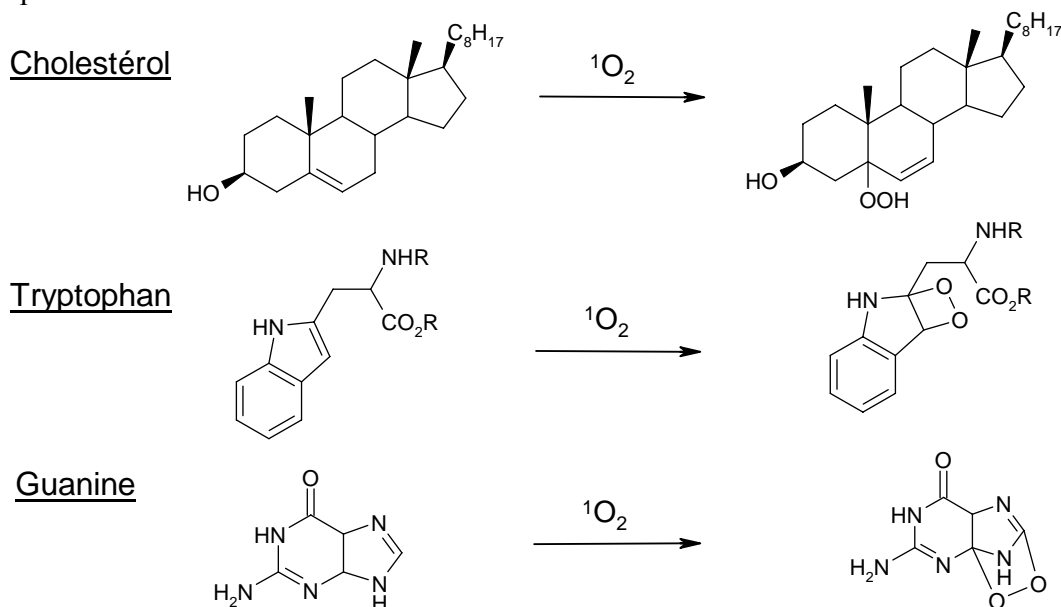


Fig. 11 : exemples d'oxydation et de cycloaddition des composants cellulaires menant à la destruction de la tumeur.

De par sa durée de vie très courte et sa forte réactivité, $^1\text{O}_2$ réagit sur son lieu de formation dans la cellule (parcourt libre moyen 0,01 – 0,02 μm). L'activité photocytotoxique dépendra d'une part de la combinaison des rendements quantiques de formation de l'état S_1 , de la

conversion de S_1 vers T_1 et de l'efficacité du transfert d'énergie de T_1 vers l'oxygène et d'autre part de la localisation du colorant.

d) Les mécanismes de la photodestruction.

Les photosensibilisateurs utilisés en PDT ont la capacité de se concentrer majoritairement dans les cellules tumorales. Bien que faisant l'objet de nombreuses études, ce mécanisme demeure mal compris. C'est sans doute la capacité des sensibilisateurs d'extravasation (fuite de la molécule hors du vaisseau sanguin dans lequel elle est injectée), leur affinité pour les cellules endothéliales en prolifération et la possibilité de formation de liaisons covalentes avec les récepteurs LDL (Low-Density Lipoprotein), jointes à l'absence de drainage lymphatique au niveau tumoral qui sont le mieux à même d'expliquer ce phénomène.

La destruction des cellules tumorales se fait par photodestruction selon deux types de mécanismes :

- un mécanisme direct provoquant des dommages cellulaires irréversibles : apoptose et nécrose,
- un mécanisme indirect provoquant des dommages vasculaires et immunitaires.

i) Les dommages cellulaires directs

Ces dommages se regroupent en deux catégories : nécrose et apoptose. La réponse cellulaire dépend essentiellement de la localisation du sensibilisateur dans les cellules et de facteurs tels la dose de colorant injectée et la lignée cellulaire.

- La nécrose :

Il s'agit d'une mort cellulaire « accidentelle » entraînant des dommages tissulaires. Lors de la nécrose, la membrane de la cellule est touchée. En effet, certains colorants lipophiles ciblent la membrane plasmique et entraînent la dégradation des lipides membranaires. La perméabilité de la membrane augmente alors et la cellule éclate. Son contenu est déversé dans le tissu environnant, déclenchant une réaction inflammatoire.

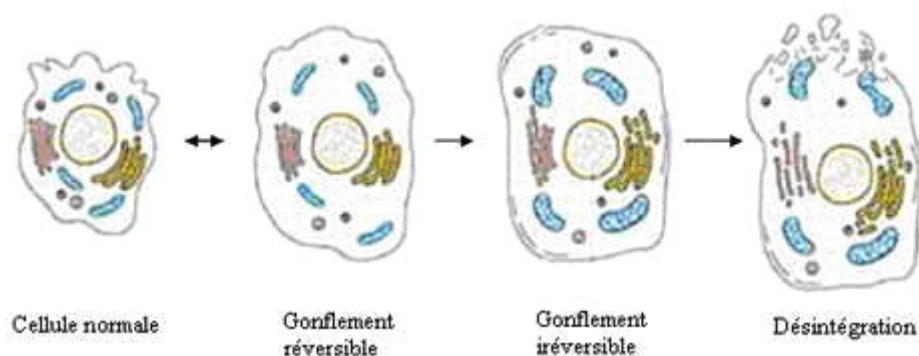


Fig. 12 : mécanisme de la nécrose

- L'apoptose :

C'est un processus d'élimination cellulaire génétiquement prédéterminé permettant le renouvellement cellulaire. Plus simplement : une mort programmée, opposée à la nécrose. Typiquement, les cellules d'un organisme s'autodétruisent lorsqu'elles ne sont plus utiles ou qu'elles ont un dysfonctionnement. Il s'agit d'un processus irréversible n'entraînant pas d'inflammation. L'élément clé déclenchant l'apoptose est la condensation de la chromatine,

suivie de la fragmentation de la cellule en corps apoptotiques qui seront ensuite phagocytés (détruites par les globules blancs).

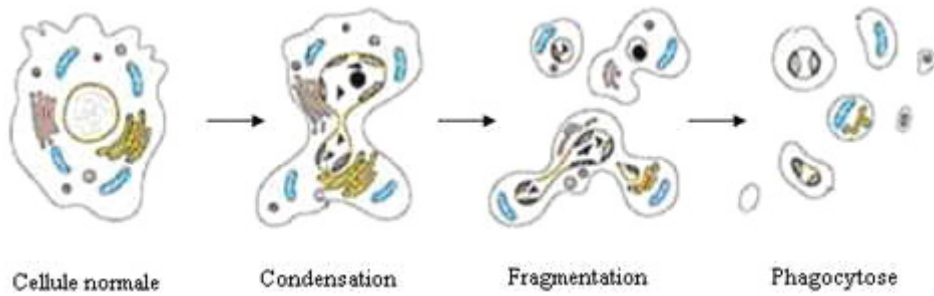


Fig. 13 : mécanisme de l'apoptose

La PDT provoque l'apoptose principalement par deux voies :

- voie mitochondriale : l'apoptose se produit lorsque le photosensibilisateur Ps est localisé dans les mitochondries. Elles effectuent alors un relargage du cytochrome C qui active la protéine Apaf-1. Cette dernière recrute des protéines, la caspase-9 et la caspase-3 pour former un complexe apoptosome. L'activation de la caspase-3 entraîne l'apoptose.

- voie « des récepteurs de mort » : ce n'est pas ici la PDT qui induit la mort mais la présence de Ps qui stimule la production de ces récepteurs. La cellule devient plus sensible aux facteurs pro-apoptotiques induisant la mort cellulaire. Les Ps vont se lier aux récepteurs de mort qui, via une protéine adaptatrice telle que FADD, conduit à l'activation de la caspase-8. Cette dernière clive et active la pro-caspase-3 en caspase-3 entraînant l'apoptose.

Voie mitochondriale

Voie des « récepteurs de mort »

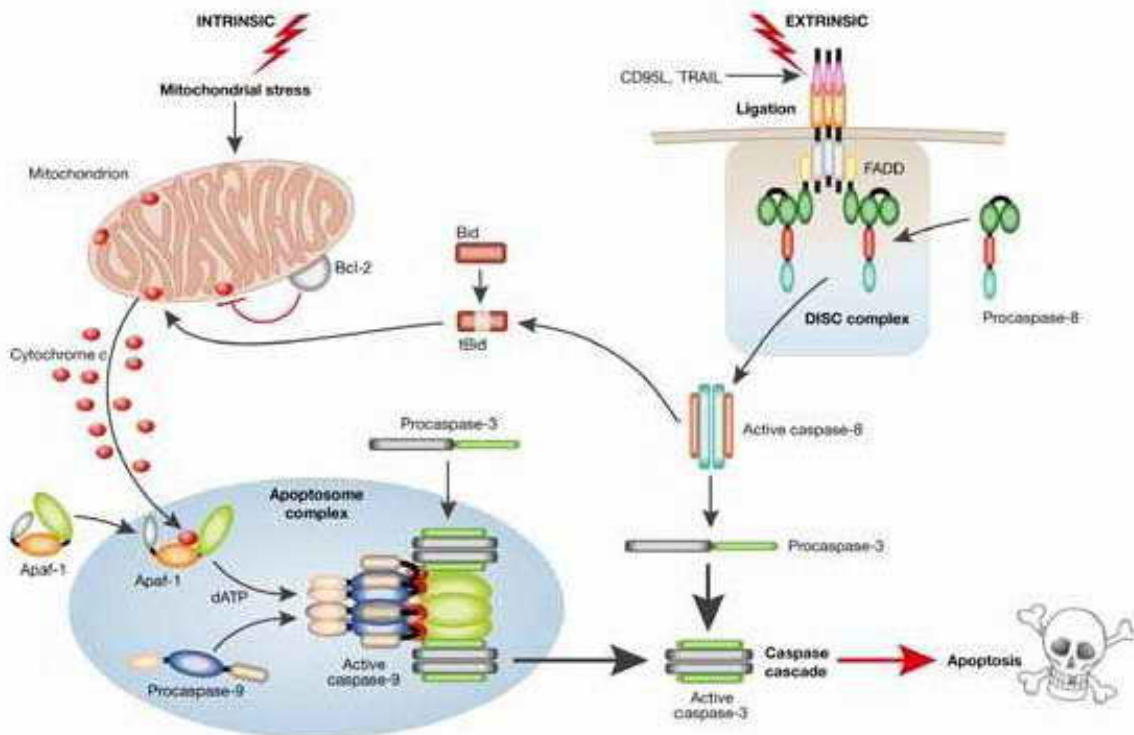


Fig. 14 : les deux principales voies d'activation de l'apoptose

Les caspases (de l'anglais cysteinyl-aspartate-cleaving proteases) sont des protéases à cystéine qui sont présentes dans le cytoplasme des cellules sous une forme inactive, les pro-caspases. Ces molécules vont être clivées puis dimérisées pour former les caspases actives. Ces enzymes sont capables de cliver d'autres protéines et d'activer d'autres caspases.

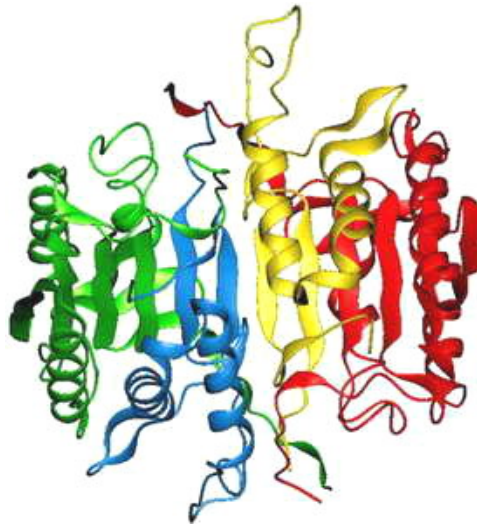


Fig. 15 : Caspase-3 humaine

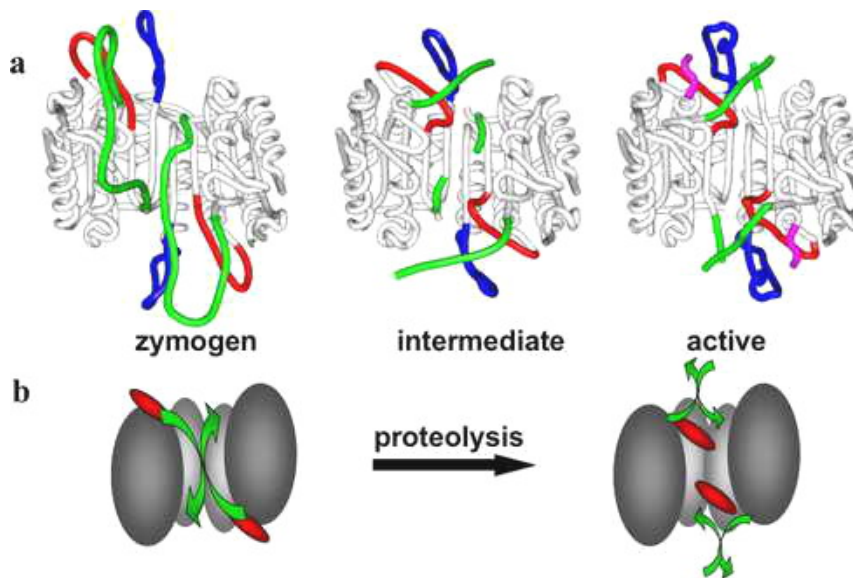


Fig. 16 : Schéma d'activation de la caspase-7. On remarque bien le clivage de la forme inactive.

Pour plus d'informations sur l'apoptose, consulter le site web : <http://www.123bio.net/revues/jericci/iapoptose.html>

ii) Les dommages cellulaires indirects

L'effet le plus rapidement détectable *in vivo* après PDT est de nature vasculaire. En effet, quelques minutes après l'irradiation, d'importants changements vasculaires sont notés autour de la tumeur, induisant une privation de la tumeur en oxygène qui conduit à la mort des cellules tumorales par asphyxie.

4. Les Photosensibilisateurs Ps

Un photosensibilisateur est une molécule capable d'être excitée par capture d'un photon et de transférer son énergie à un composé accepteur.

Ainsi, la PDT nécessite un colorant présentant une importante absorption de la lumière, par exemple les composés tétrapyrroliques qui possèdent un large spectre d'absorption dans le domaine du visible (de 400 à 850nm).

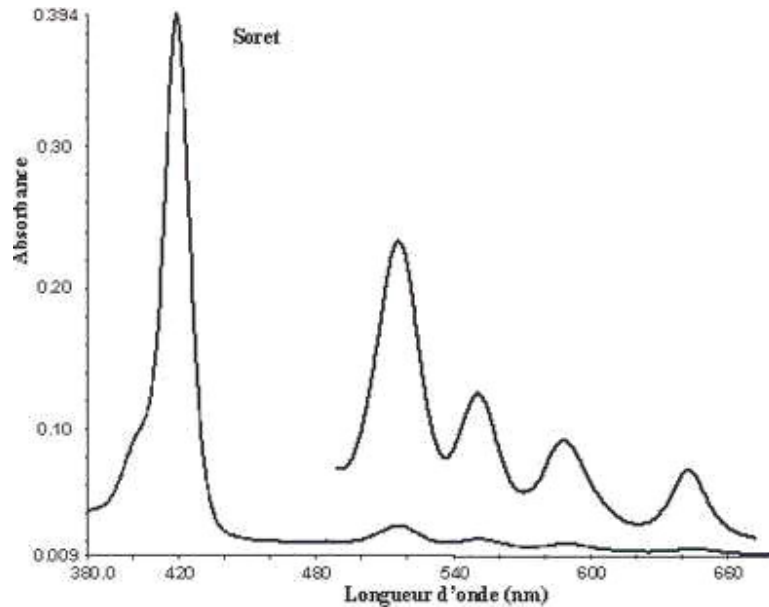


Fig. 17 : spectre d'absorption d'une porphyrine *méso*-substituée

Les tissus humains (notamment grâce à l'hémoglobine) absorbent une partie de la lumière visible. On en a tous fait l'expérience : si on place sa main sur une lampe torche allumée, la main apparaît nimbée d'un halo rouge.

Il apparaît que l'absorption de lumière la plus importante se situe autour de 400 nm (ce qui explique que notre main nous apparaisse rouge). La pénétration de la lumière dans les tissus vivants dépend fortement de la longueur d'onde. Ainsi, une lumière rouge pénétrera plus profondément dans les tissus qu'une lumière bleue ou verte :

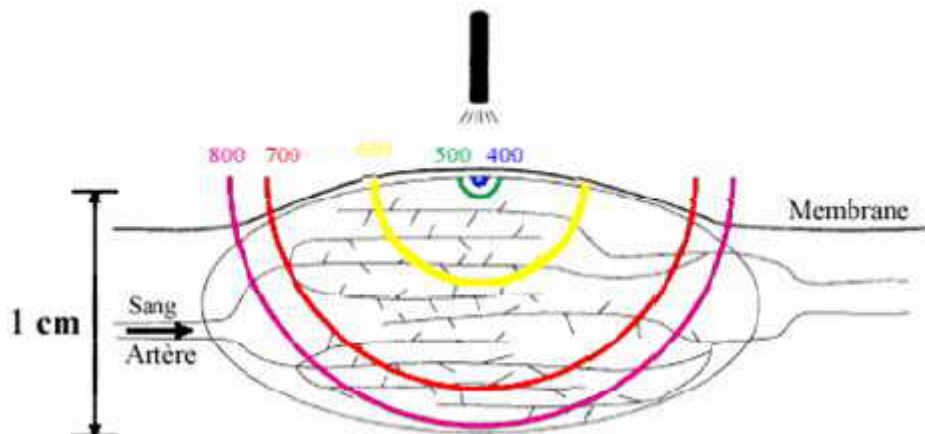


Fig. 18 : pénétration de la lumière en fonction de la longueur d'onde

Les molécules les plus couramment utilisées en tant qu'anticancéreux se répartissent en plusieurs classes :

- les photosensibilisateurs non tétrapyrroliques,
- les photosensibilisateurs tétrapyrroliques :
 - de première génération : les molécules d'origine naturelle,
 - de deuxième génération : les molécules de synthèse,
 - de troisième génération : les molécules vectorisées.

a) Les photosensibilisateurs non tétrapyrroliques

- Les psoralènes

Il s'agit d'une classe de composés que l'on rencontre dans les familles des *Umbelliferae* et les *Rutaceae*. Ils se répartissent en composés linéaires et angulaires :

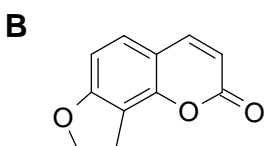
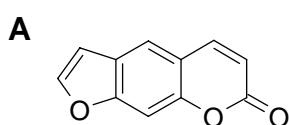


Fig. 19 : A) Psoralène ; B) Angelicin



Fig. 20 : *Ammi majus* Linnaeus

En 1947, Fahmy extrait des composés cristallins de l'*Ammi majus* Linnaeus qu'il identifie comme le 8-méthoxypsoralène (8-MOP) et le 5-méthoxypsoralène (5-MOP).

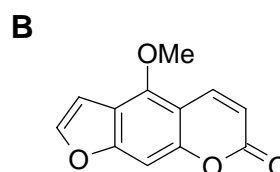
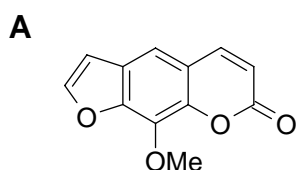


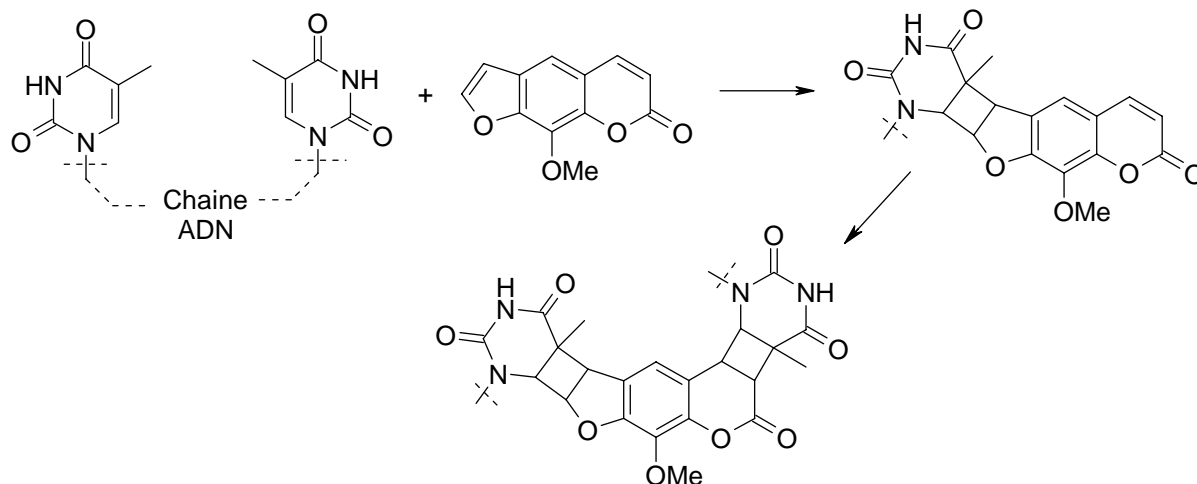
Fig. 21 : A) 8-MOP ; B) 5-MOP

Ces molécules sont utilisées dans le traitement du psoriasis. Il s'agit d'une maladie chronique et bénigne de la peau, d'origine inconnue, touchant près de 2 % de la population mondiale. Bien que non grave, la maladie peut entraîner une diminution de la qualité de vie des sujets en raison de modifications physiques parfois importantes. Elle est caractérisée par une lésion érythémateuse (rougeur) surmontée de squames, des cellules mortes en excès qui s'accumulent puisque le renouvellement cellulaire est accéléré dans cette maladie.

Actuellement, la puvathérapie (photochimiothérapie aux psoralènes) consiste à administrer un médicament, suivi d'une exposition aux UVA deux heures plus tard.

Ces molécules n'agissent pas ici par la formation d'oxygène singulet mais par action directe sur l'ADN et l'ARN.

En effet, sous l'action des UVA, les psoralènes vont s'intercaler entre deux brins d'ADN ou d'ARN et réaliser un pontage entre deux bases azotées (la thymine). Cet insertion va bloquer la réplication de l'ADN et donc stopper le développement de la maladie :



Photoadduit bloquant la réplication de l'ADN

Fig. 22

- Le bleu de méthylène

Il est utilisé pour la décontamination de plasma fraîchement congelé (en Suisse et Allemagne). Ce colorant a longtemps été utilisé dans les analyses biologiques et comme marqueurs de tumeurs en chirurgie. Il absorbe à une longueur d'onde $\lambda = 660 \text{ nm}$ ($\epsilon = 88\,000 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Malgré un bon rendement quantique de formation d'oxygène singulet, ce composé est peu utilisé *in vivo* en raison de sa rapide dégradation par des enzymes.

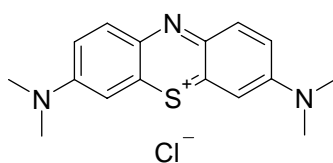


Fig. 23

- L'hypericine

Il s'agit qu'une quinone extraite de l'*Hypericum perforatum* (Millepertuis perforé).

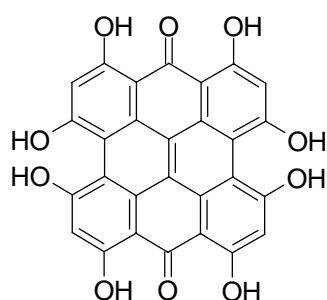


Fig. 24 : Hypericine



Fig. 25 : l'*Hypericum perforatum*

Koren a mis en évidence l'efficacité de cette molécule en PDT (maximum d'absorption pour $\lambda = 590 \text{ nm}$, $\epsilon = 41600 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$). La mort cellulaire est causée par l'action conjuguée d'un radical semi-quinone, d'oxygène singulet et de l'anion superoxyde. Ce dernier provoque peu de dommages cellulaires mais est transformé en peroxyde d'hydrogène (comme précisé précédemment).

b) Les colorants tétrapyrroliques de première génération

La première génération regroupe l'hématoporphyrine et ses dérivés (Hp, HpD). L'HpD est obtenue par Lipson à partir de l'hémoglobine du sang par un traitement avec un mélange d'acides sulfurique et acétique, suivi d'un traitement alcalin. Il ne s'agit pas d'un composé unique mais d'un mélange de monomères et d'oligomères (polymères de porphyrines reliés par des ponts ester, éthers et carbone) qui peuvent être partiellement séparés par HPLC :

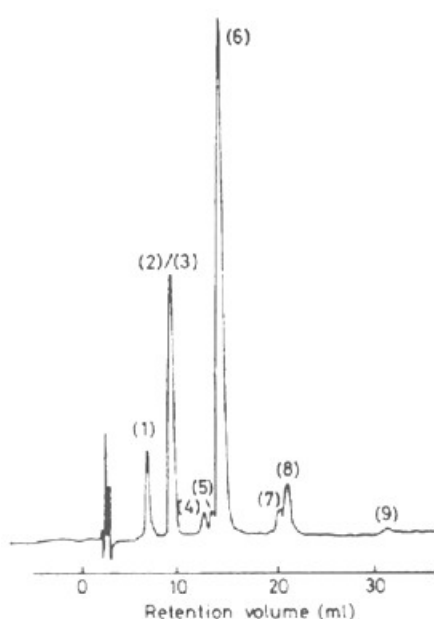


Fig. 26 : séparation des composants de l'HpD après lavage acide, par HPLC. 1) Hématoporphyrine ; 2/3) isomères de l'O-acétyl-hématoporphyrine ; 6) O,O'-Diacétylhématoporphyrine.

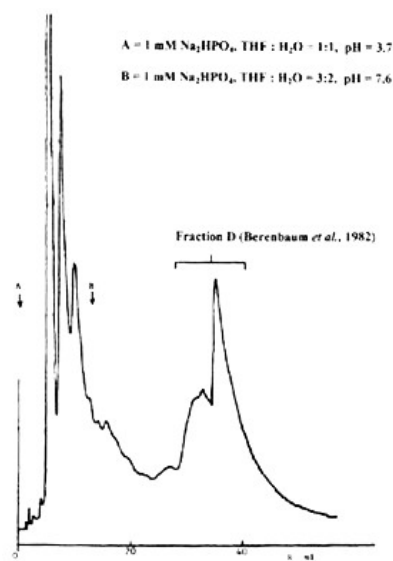


Fig. 27 : séparation des composants de l'HpD après lavage basique par HPLC. Les monomères constituent les trois premiers pics. La fraction D contient les oligomères responsables de la majeure partie de l'activité biologique.

Un mélange enrichi en oligomères est commercialisé sous l'appellation **Photofrin®**.

Cependant, de par sa nature de mélange complexe mal défini, ce produit pose certains problèmes :

- la préparation d'un échantillon n'est pas reproductible et il est donc difficile d'obtenir les mêmes propriétés photodynamiques d'un échantillon à l'autre.
- l'HpD a une durée de vie importante dans l'organisme (de 3 à 5 semaines) entraînant un risque de photosensibilisation. L'élimination de ce colorant, qui se fixe entre autres dans les tissus sains et la peau, est en effet lente.
- l'HpD montre une faible sélectivité pour les cellules tumorales, ce qui implique un risque de dommage pour les tissus sains.

Comme expliqué précédemment, le Ps doit avoir une forte absorption dans le rouge, ce qui n'est pas le cas de l'HpD ou du **Photofrin®** :

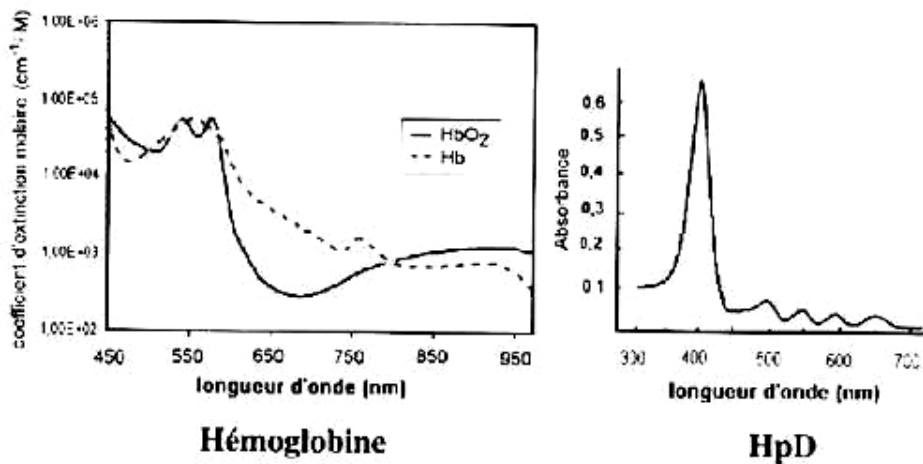


Fig. 28 : spectres d'absorption de l'hémoglobine et de l'HpD

Malgré cette limitation, le colorant est excité par une lumière de longueur d'onde $\lambda = 630$ nm afin de favoriser au maximum la pénétration de lumière dans les tissus et l'effet thérapeutique.

Pour pallier à ces inconvénients, les caractéristiques du Ps idéal ont été définies. Celui-ci doit :

- être de structure chimique parfaitement définie et de synthèse reproductible, transposable à une grande échelle avec un coût le plus faible possible,
- être non cytotoxique à l'obscurité,
- se concentrer préférentiellement dans les cellules tumorales et être éliminé le plus rapidement possible des tissus sains pour ne pas générer d'effets secondaires,
- avoir une forte réactivité photochimique à l'état triplet pour produire efficacement de l'oxygène singulet 1O_2 . De plus, il ne doit pas s'agréger dans le milieu cellulaire (ce qui entraîne une forte diminution du rendement de formation de 1O_2),
- posséder une forte absorption de la lumière rouge ($\lambda > 650$ nm) afin que l'effet thérapeutique soit le plus profond possible,
- être stable vis-à-vis des enzymes circulantes et de la lumière d'irradiation afin de d'atteindre les cellules tumorales intact et de ne pas être dégradé trop rapidement pendant l'illumination.

c) Les colorants macrocycliques tétrapyrroliques de deuxième génération

Ce sont des molécules développées ces dernières années possédant une forte absorption dans le rouge, s'éliminant plus rapidement de l'organisme que le **Photofrin®** et présentant des risques de photosensibilisation secondaire limités.

Parmi ces molécules, on retrouve des chlorines, phtalocyanines et bactériochlorines qui possèdent une absorption dans le rouge plus intense que les porphyrines :

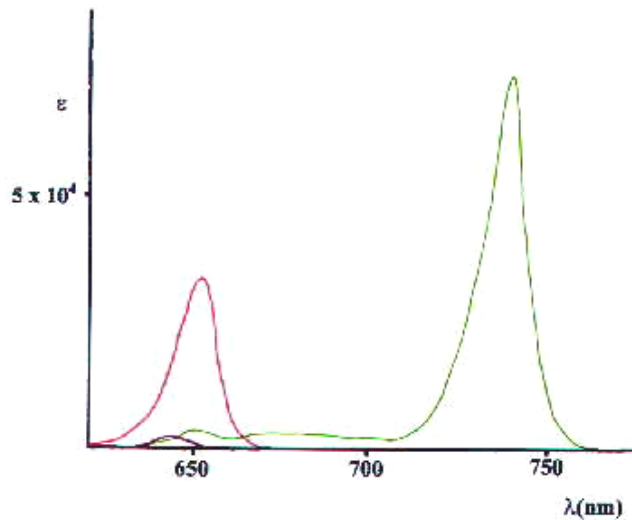


Fig. 29 : spectre optique des bandes Q d'une chlorine (rouge) et d'une bactériochlorine (vert) par rapport à une porphyrine (noir)

Nous présenterons quelques exemples de ces Ps de deuxième génération :

- l'acide 5-aminolévulinique (ALA)

Il s'agit d'un acide aminé présent dans notre organisme.

Comme précisé sur le schéma de biosynthèse de l'hème, il est le précurseur de la protoporphyrine IX (Pp-IX) qui est le Ps impliqué dans le traitement par PDT.

Dans la cellule, la biosynthèse de l'hème est finement contrôlée :

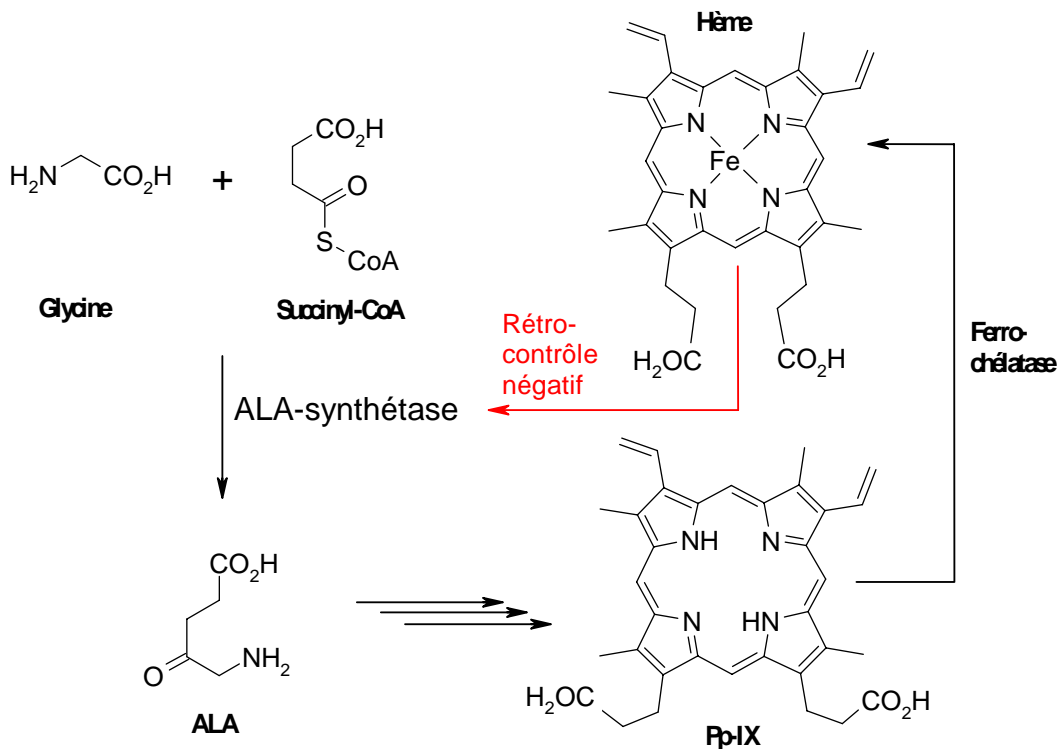


Fig. 30 : schéma simplifié de la biosynthèse de l'hème

Lorsque la concentration en hème est suffisante (de l'ordre de 10^{-8} à 10^{-7} M en milieu physiologique), il existe un rétrocontrôle agissant directement sur l'ALA-synthétase qui bloque la formation de l'ALA et donc de l'hème.

Ce système peut être contourné par administration d'ALA exogène en concentration importante. L'ALA sera rapidement transformé en Pp-IX mais la ferrochélatase en revanche ne pourra pas convertir aussi rapidement la Pp-IX en hème, d'où une accumulation importante de Pp-IX dans la cellule où il agira en tant que Ps.

L'acide 5-aminolévulinique (ALA), commercialisé sous l'appellation **Lévulan®** (AMM en France en 2000) est principalement utilisé en dermatologie, en application locale suivie d'une irradiation avec une lumière de longueur d'onde $\lambda = 635$ nm, en traitement des maladies de peau telles que le psoriasis ou des kératoses actiniques (lésions cancéreuse de la peau).

- La méta-(tétrahydroxyphényl)chlorine (*m*-THPC)

Il s'agit de la molécule qui a montré la meilleure activité photo dynamique dans une série d'analogues *méso*-tétrahydroxyphénylchlorines et porphyrines. La *m*-THPC possède une forte absorption dans le rouge (bien plus importante que son analogue porphyrinique) et même à de faibles concentrations, elle montre une réponse photodynamique satisfaisante.

Ce composé, commercialisé sous le nom **Foscan®** a reçu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) dans plusieurs pays en 2002 pour le traitement des cancers du cou et de la tête.

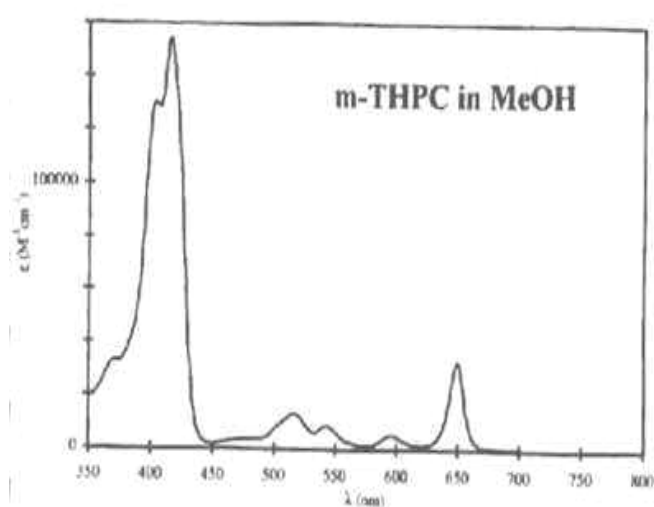
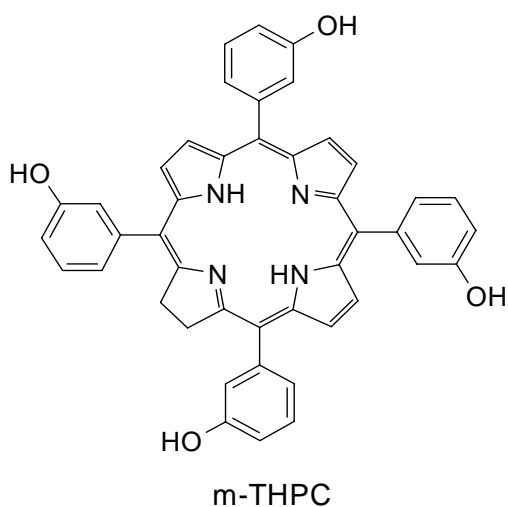
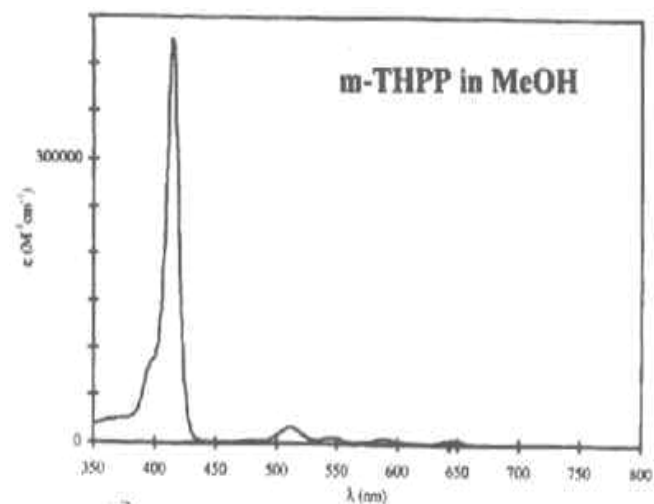
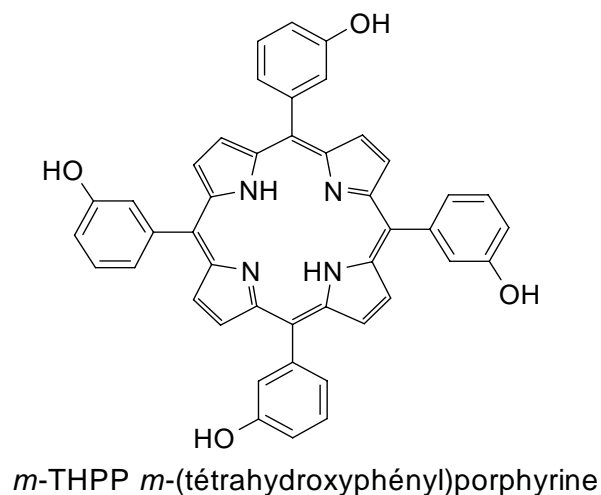


Fig. 31 : *m*-THPP et *m*-THPC (Foscan®)

Fig. 32 : spectres des *m*-THPP et *m*-THPC

- L'étiopurpurine stannylé SnEt₂ : Puryltin®

Il s'agit d'un dérivé de porphyrine : une purpurine qui a montré des résultats préliminaires encourageants dans le traitement du cancer métastatique du sein, et dans le sarcome de Kaposi, maladie cancéreuse touchant principalement la peau, les muqueuses et les ganglions lymphatiques. Cette maladie peut résulter d'une surcroissance de vaisseaux sanguins. Ce médicament est actuellement en essais cliniques phase III pour le traitement de la DMLA humide (la dégénérescence maculaire due à l'âge, principale cause de cécité chez les personnes de plus de 50 ans). Cette maladie entraîne une perte progressive de la vision en raison du développement de nouveaux vaisseaux sanguins sous la rétine pouvant entraîner hémorragie, gonflement et formation de tissu cicatriciel.

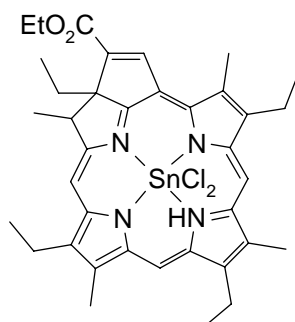


Fig. 33 : étiopurpurine stannylé SnEt₂ : Puryltin®

- la mono-L-aspartylchlorin e₆ : MACE, NP6®

Il s'agit d'une chlorine soluble dans l'eau, développée au Japon et en essai clinique pour le traitement de cancer de la peau et du poumon. Elle présente l'avantage d'un temps réduit (4 heures contre 48 pour le **Photofrin®**) d'attente entre l'injection du Ps et l'exposition lumineuse ainsi qu'une faible photosensibilisation résiduelle de la peau. Des résultats préliminaires encourageants concernant la destruction de la néovascularisation de rétine sans dommages collatéraux ont été rapportés.

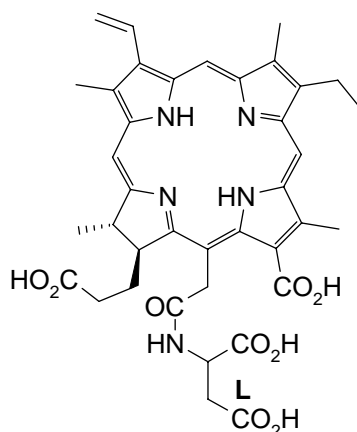


Fig. 34 : mono-L-aspartylchlorin e₆ : MACE, NP6®

- la chloro(phtalocyanine sulfonato)-Al^(III) : AlPcS_x

Il s'agit ici d'un dérivé de type tétra-azaporphyrine, et plus particulièrement une phtalocyanine. Ce sont des composés absorbant fortement dans le rouge et utilisés généralement sous forme de complexes métalliques. La sulfonation de la chloroaluminium phtalocyanine conduit à la formation de composés comportant un nombre variable de groupes sulfonates SO₃⁻ fixés sur différentes positions. Le dérivé disulfoné adjacent de la

phtalocyanine d'aluminium III est le plus actif en PDT mais la séparation et la purification des différents composés issus de la sulfonation sont difficiles.

Ainsi un mélange des composés di- et trisulfonés est employé par Stradnadko à Moscou (sous l'appellation **Photosens®**) pour des essais cliniques. Plusieurs centaines de patients ont été traités avec des résultats encourageants pour des cancers de la peau, du sein et de l'œsophage. Il a été noté une photosensibilité résiduelle après traitement et une augmentation de l'activité du colorant *in vivo* lors de prise d'acide ascorbique ou d'ascorbate de sodium (vitamine C).

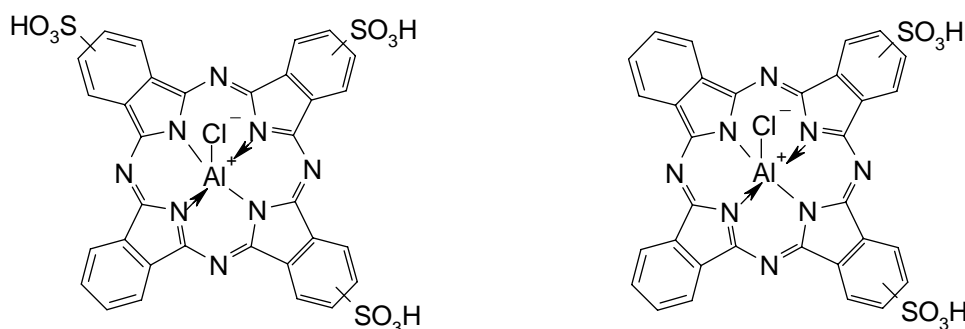


Fig. 35 : chloro(phtalocyanine sulfonato)-Al(III) , Photosens® (mélange des acide di- et trisulfoniques)

- la Verteporfin, un dérivé de type benzoporphyrine mono-acide (BDP-MA)

Il s'agit de la molécule la plus active d'une série de BDP. Bien que la BDP-MA ne soit pas actuellement utilisée en thérapie antitumorale, elle s'est avérée très efficace pour le traitement de la DMLA (dégénérescence maculaire) et a reçu une AMM en 2000 pour cette application sous le nom **Visudyne®**.

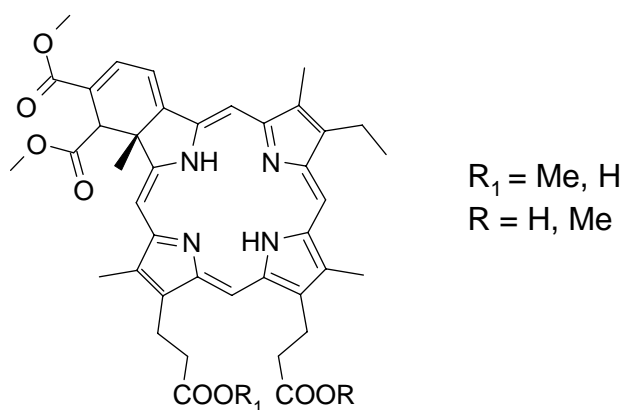


Fig. 36 : Verteporfine ou Visudyne®

- la téxaphyrine lutétium : Lutex®

Les téxaphyrines sont des molécules analogues aux porphyrines où un groupe pyrole est remplacé par un groupe N,N'-diméthylène-benzène-1,2-diamine conférant plus de stabilité et un cœur 20 % plus large qui permet l'insertion du lutétium.

Commercialisé sous l'appellation **Lutex®**, il s'agit d'un photosensibilisateur non porphyrinique testé en phase II pour le traitement du cancer de la prostate, du sein et le mélanome. Il possède une bonne sélectivité pour les tissus tumoraux (facteur 10/1 en faveur des tissus tumoraux par rapport aux tissus normaux), s'élimine en quelques heures et ne présente que peu de photosensibilisation résiduelle après traitement.

De par la présence d'un atome lourd diamagnétique, le **Lutex®** présente un bon rendement de formation d'oxygène singulet et présente une absorption maximale à 732 nm (zone de transparence maximale de l'hémoglobine).

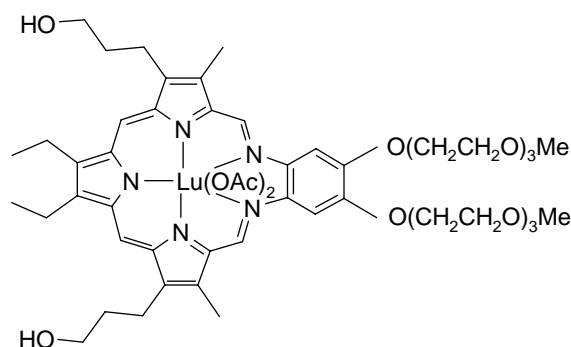


Fig. 37 : téxaphyrine lutétium : Lutex®

- La bactériochlorophylle de palladium :

Il s'agit d'un Ps métallé lipophile présentant la structure d'une bactériochlorophylle. Son absorption maximale se situe à 760 nm ce qui permet à la lumière de pénétrer profondément dans les tissus (jusqu'à 2 cm au lieu de 3 à 5 mm pour les porphyrines).

La bactériochlorophylle de palladium, commercialisée sous l'appellation **Tookad®** est utilisée dans le traitement de tumeurs solides allant jusqu'à 4 cm de diamètre (cancer de la prostate).

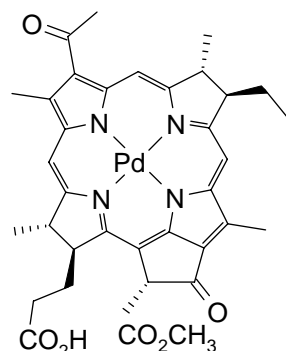


Fig. 38 : bactériochlorophylle de palladium, Tookad®

Les principales propriétés des photosensibilisateurs de deuxième génération peuvent être regroupées dans le tableau suivant :

Composé	Longueur d'onde d'irradiation (nm)	Rendement de formation de $^1\text{O}_2$	Dose type de produit (mg.kg^{-1})	Dose type de lumière (J.cm^{-2})	Temps type d'illumination (s)
δ -ALA	635	0.6	60	50-150	500-1500
<i>m</i> -THPC	652	0.43	0.15	5-20	50-200
SnEt_2	659	0.6	1.2	150-200	1500-2000
MACE	660	0.8	1.0	25-200	1500
Photosens®	675	0.34	1.0	50-200	1500
BPDMA	690	0.7	4	150	1500
Lutex®	732	0.11	1.0	150	1500

Il apparaît que la m-THPC est l'un des Ps les plus prometteurs avec de faibles doses requises, à la fois de produit et de lumière, accompagnées du plus court temps d'illumination. En revanche, il induit une photosensibilisation de la peau pouvant aller jusqu'à 5 semaines.

d) Les colorants macrocycliques tétrapyrroliques de troisième génération

Les Ps de troisième génération sont actuellement en voie de développement. Ce sont des molécules substituées par des motifs chimiques reconnus spécifiquement par un type cellulaire. Ces ligands spécifiques peuvent être reconnus via des aminoacides, des carbohydrates (vulgairement, des sucres) ou des stéroïdes.

i) Le complexe estradiol-porphyrine (E_2 -Por).

Il s'agit d'un noyau de type tétraphénylporphyrine relié à l'estradiol par le biais d'un bras espaceur. Cette molécule reconnaît les récepteurs à oestrogènes (ER) qui sont surexprimés par les cellules dans certains cancers (cerveau, ovaires, seins).

Les résultats montrent que les ER reconnaissent sélectivement le Ps E_2 -Por bien que l'activité photodynamique soit encore faible (en raison du noyau porphyrine peu actif). Des travaux visant à remplacer la porphyrine par une chlorine plus active sont en cours.

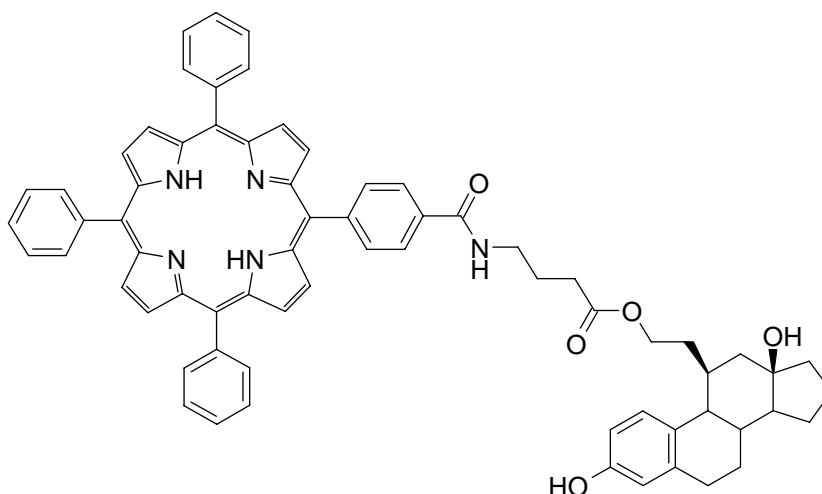


Fig. 39 : complexe estradiol-porphyrine

ii) Le complexe 4-carboxyphénylporphyrine-acide folique (Por-COOH-Fa)

C'est une molécule ciblant les récepteurs à acide folique.

Ces récepteurs sont en effet surexprimés à la surface de nombreuses cellules cancéreuses (cancer du cerveau, des ovaires, des poumons...) et sont difficiles d'accès à la surface des cellules saines. Ce sont donc des cibles privilégiées.

Durant les tests *in vitro*, le complexe montre une forte affinité pour ces récepteurs, même si le mécanisme de transport de l'acide folique à l'intérieur de la cellule n'a pas été élucidé. De plus, l'activité photodynamique du complexe est très supérieure à celle du Ps seul.

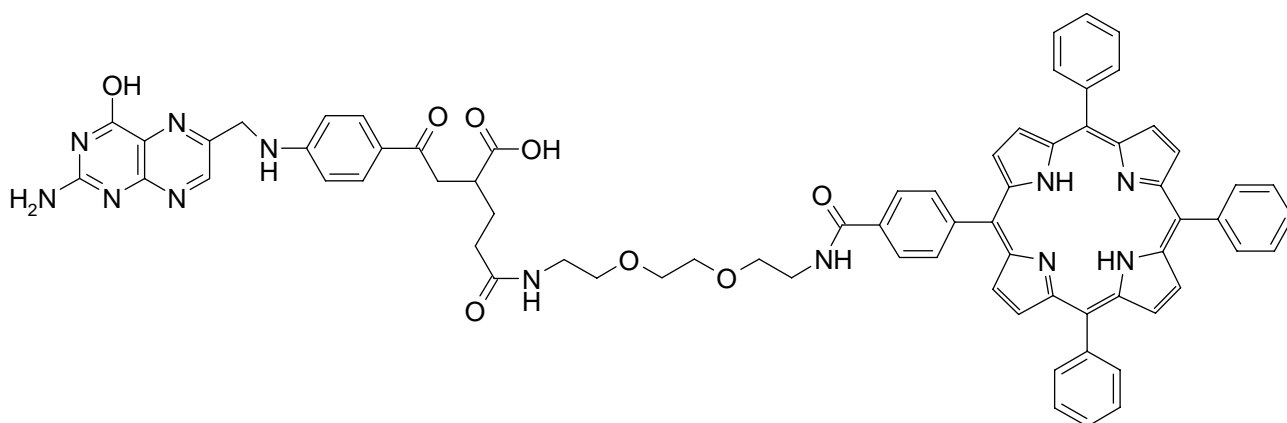


Fig. 40 : complexe 4-carboxyphénylporphyrine-acide folique

iii) Les photosensibilisateurs glycoconjugués.

Ce sont des macrocycles tétrapyrroliques portant des unités glycosyles (des sucres) susceptibles d'être reconnues spécifiquement par des récepteurs présents à la surface des cellules tumorales. En effet, les membranes cellulaires contiennent diverses protéines, parmi lesquelles des récepteurs lectines capables de reconnaître spécifiquement les résidus glycosidiques. Ces récepteurs sont spécifiques d'un sucre ; par exemple le récepteur lectine DC-SIGN est spécifique du mannose.

Par l'étude de la phototoxicité *in vitro* de nombreux macrocycles tétrapyrroliques glycoconjugués, Mometeau a montré que les macrocycles substitués dissymétriquement par deux ou trois monosaccharides sont les plus cytotoxiques.

On pourra noter que le remplacement d'un monosaccharide par un disaccharide diminue, voire supprime totalement l'action phototoxique.

Plusieurs générations de macrocycles tétrapyrroliques se sont ainsi succédées :

- les porphyrines glycosylées présentant un motif dérivé d'acide aminé

Elles portent un ou plusieurs acides aminés (alanine) et ont été préparées pour cibler des récepteurs glycosidiques mais également des sites spécifiques à ces acides aminés.

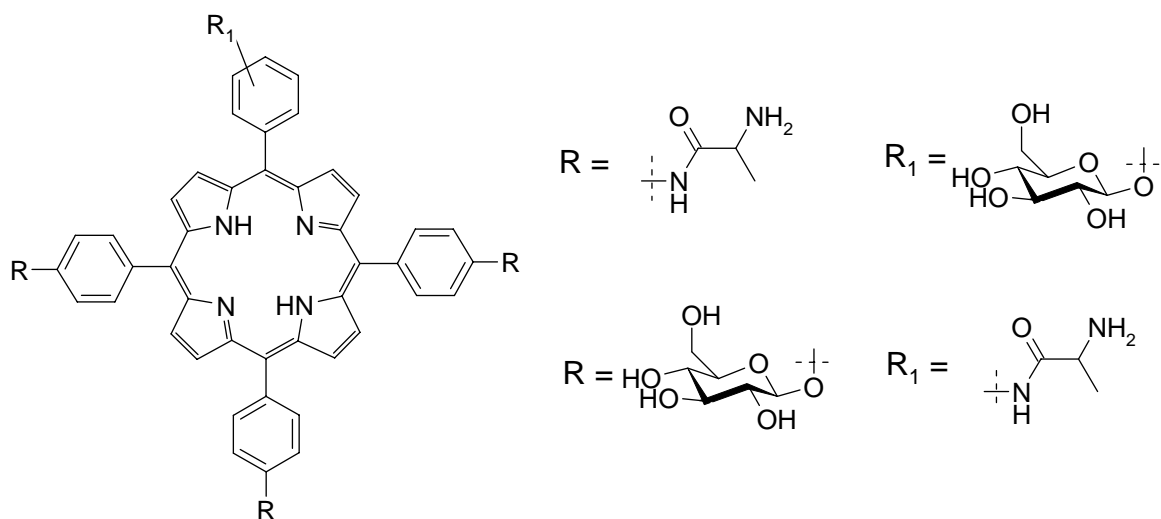


Fig. 41 : porphyrines substituées par des sucres et acides aminés

- les porphyrines purement glycosylées

La porphyrine suivante, qui est un candidat potentiel pour un traitement curatif du rétinoblastome, est à rattacher à cette catégorie. Le rétinoblaste est la tumeur maligne intraoculaire la plus commune de l'enfant, touchant 1 bébé sur 20 000 naissances. Le traitement actuel de cette maladie orpheline est basé sur l'utilisation d'anticancéreux mutagènes (tel le carboplatine) qui augmente le risque de développement de tumeurs secondaires.

Et si cette porphyrine para-triglucoconjugée n'est pas aussi efficace que le **Foscan®**, elle présente une toxicité *in vitro* inférieure à celui-ci, à l'obscurité.

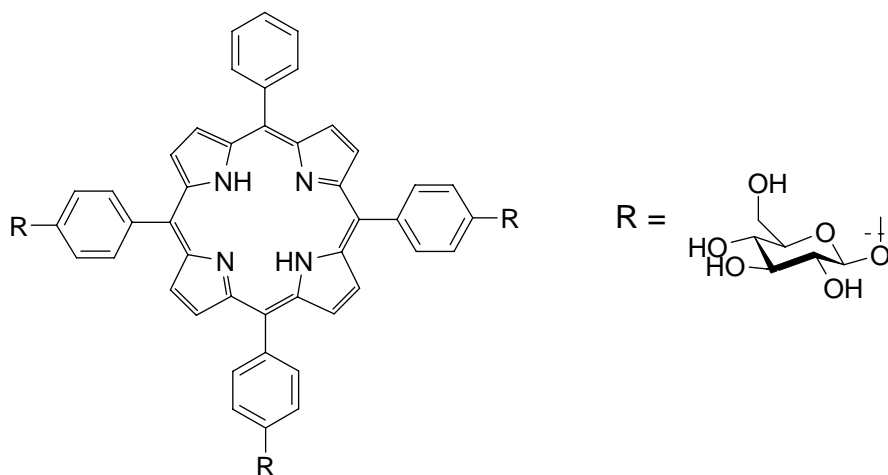


Fig. 42 : porphyrine para-triglucoconjugée présentant une bonne activité *in vitro* dans le traitement du rétinoblastome.

- les porphyrines cationiques substituées par des sucres

Elles sont préparées pour cibler les récepteurs des sucres et être solubles dans l'eau.

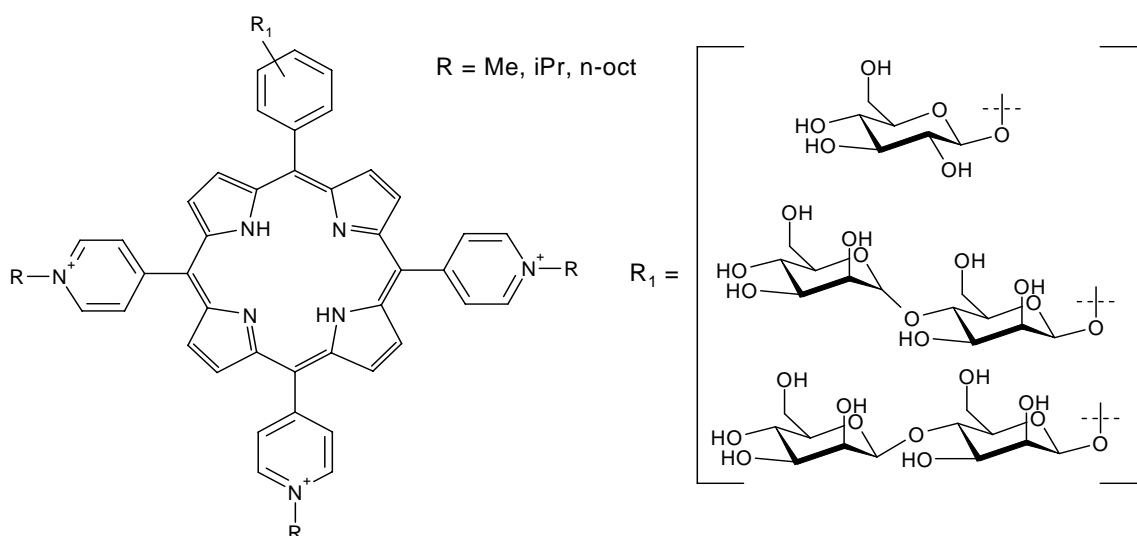


Fig. 43 : porphyrines glycosylées cationiques

- les complexes RGD-porphyrine-sucre (arginine, glycine, acide aspartique).

Ces molécules ont pour but de cibler spécifiquement les récepteurs α_v - 3β -intégrines, surexprimés à la surface des cellules tumorales.

Dans ce cas, les sucres ont un rôle de solubilisant tandis qu'un peptide spécifique assure la reconnaissance moléculaire.

Krausz a d'abord synthétisé une molécule portant trois unités glucoses et un peptide (RGD) greffé via un bras espaceur. Cependant, ce peptide étant facilement hydrolysable par certaines enzymes (les peptidases), une forme cyclique plus stable de ce peptide fut synthétisée.

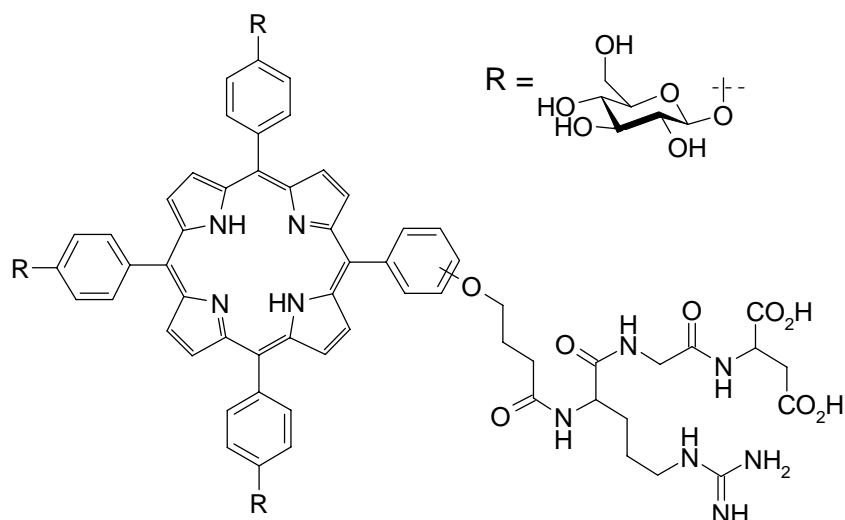


Fig. 44 : complexe linéaire RGD-porphyrine-glucose

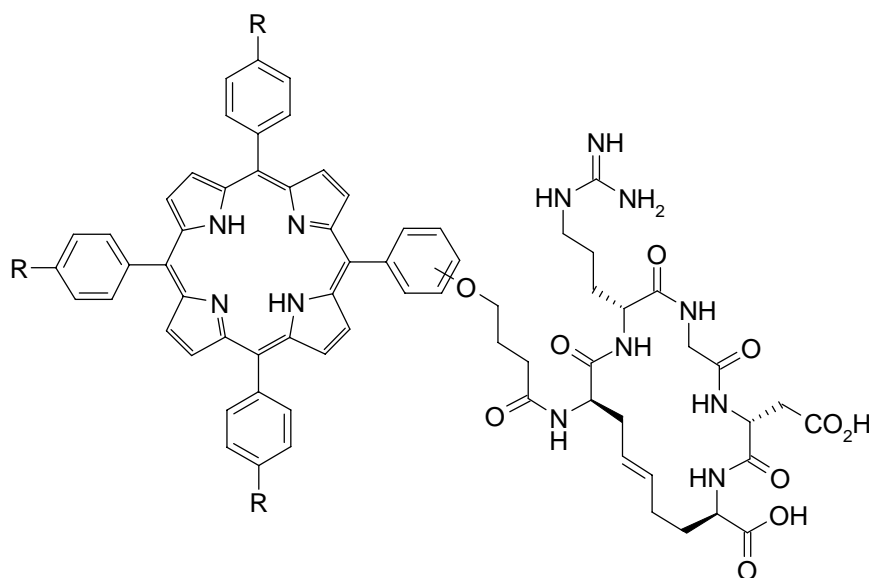


Fig. 45 : complexe cyclisé RGD-porphyrine-glucose.

- les chlorines-carbohydrates à bras espaceur.

Il s'agit de placer le sucre sur un bras espaceur relié à la chlorine. Zeng a ainsi montré que des chlorines- β -galactose ont une forte affinité pour les récepteurs galectines tout en présentant une bonne activité photodynamique.

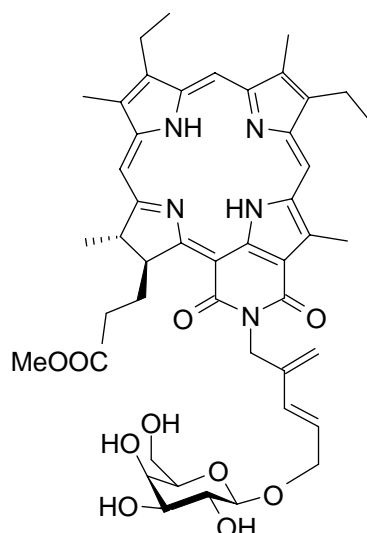


Fig. 46 : chlorine-β-galactose

De même, Laville et Maillard ont développé une nouvelle classe de molécules triglycoconjuguées (fig. 47) capables de cibler spécifiquement – *in vitro* - les lectines surexprimées sur les cellules de rétinoblastome.

Ils ont montré l'apport de la glycosylation (ajout de sucres) par rapport à la molécule ne possédant que le bras espaceur (diéthylène glycol) (fig. 48), cette dernière n'étant pratiquement pas phototoxique.

La substitution des trois fonctions alcools par des monosaccharides augmente fortement l'activité photodynamique.

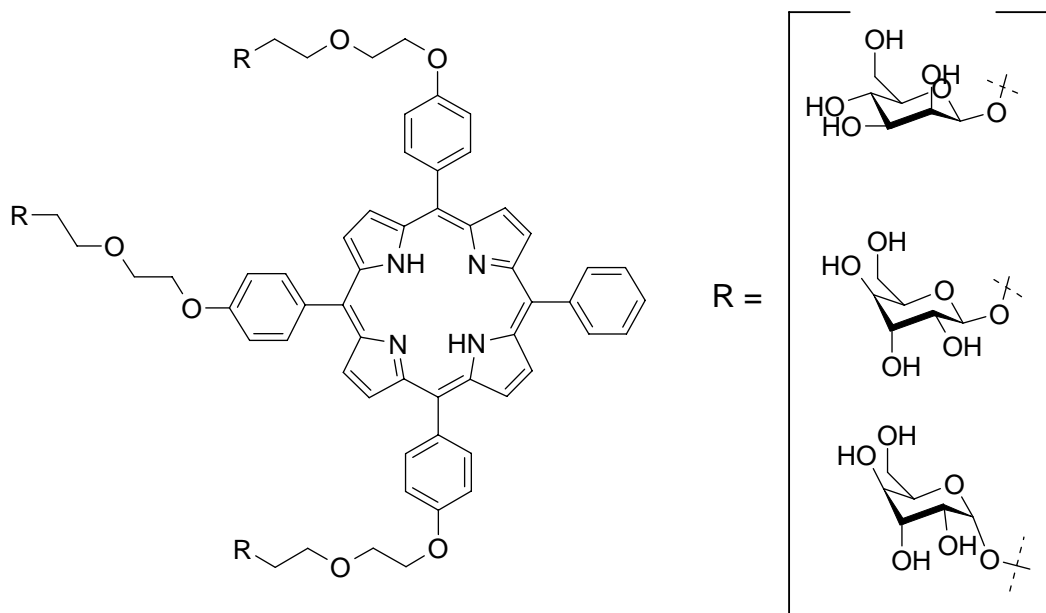


Fig. 47 : A) porphyrine triglycoconjuguée.

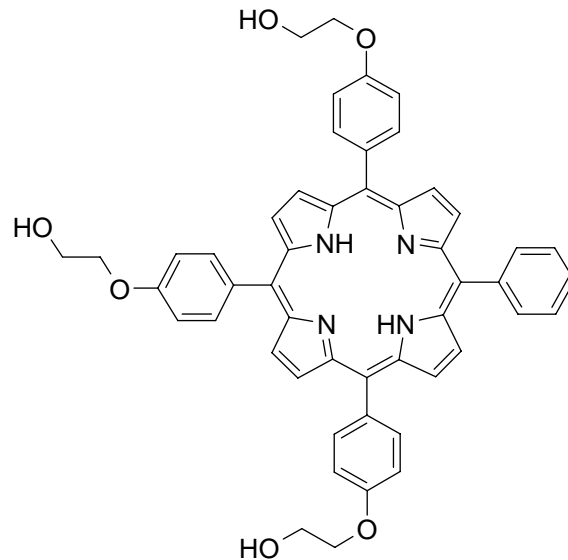


Fig. 48 : porphyrine à bras espaceur diéthylène glycol nonglycosylée

- Les photosensibilisateurs fonctionnalisés par des chaînes protéiniques.

Il s'agit ici de molécules macrocycliques tétrapyrroliques liées à des groupements permettant le ciblage de la cellule par le Ps.

Nous pouvons ici citer une molécule "chimère" obtenue par liaison covalente entre la sous-unité B de la toxine de Shiga et une porphyrine. Les mesures de son activité photodynamique *in vitro* montrent que celle-ci est dépendante de la présence, sur les membranes des cellules utilisées, de récepteurs transmembranaire de la toxine.

La toxine de Shiga est composée de deux unités : A et B. La sous-unité B se lie à certains glycolipides spécifiques de la membrane (le globotriaosylceramide (Gb3)) ce qui permet au Ps de se lier spécifiquement à la cellule visée.

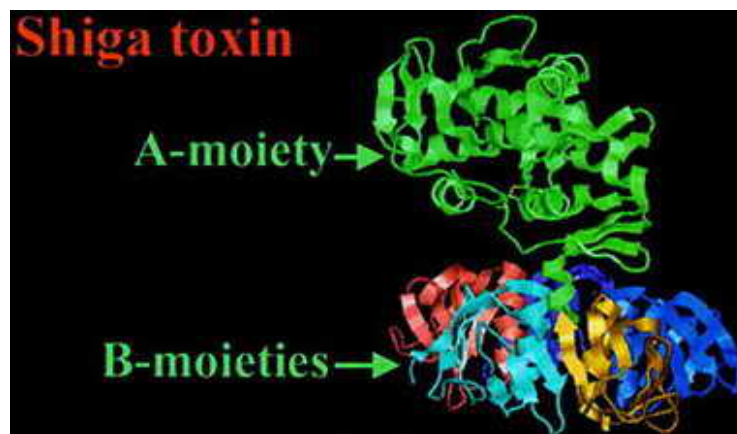


Fig. 49 : toxine de Shiga

5. La fluorescence des photosensibilisateurs

a) Utilisation de la fluorescence pour la détection des tumeurs

D'après le diagramme de Jablonski, si l'on irradie un photosensibilisateur à une longueur d'onde donnée, il sera possible d'observer la fluorescence de ce dernier.

Ainsi la fluorescence peut non seulement être un moyen de déterminer la localisation du sensibilisateur dans les cellules (fig 50), mais peut également être employée pour la détection des tumeurs (fig 51) et constitue ainsi un outil de diagnostic.

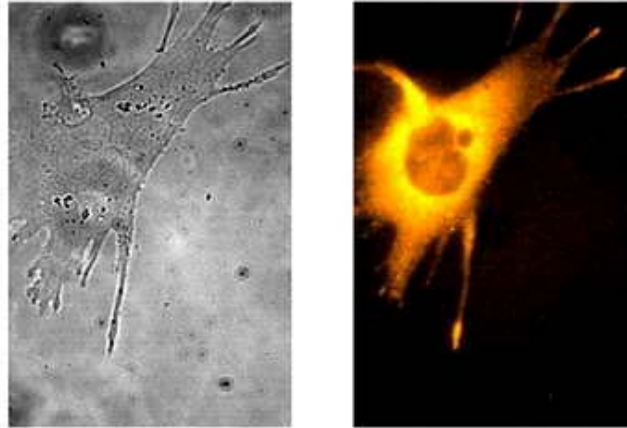


Fig. 50 : fluorescence de la *m*-THPC dans une lignée de cellules RIF-1. On pourra noter la localisation préférentielle du sensibilisateur dans le cytoplasme par rapport à la membrane cellulaire.

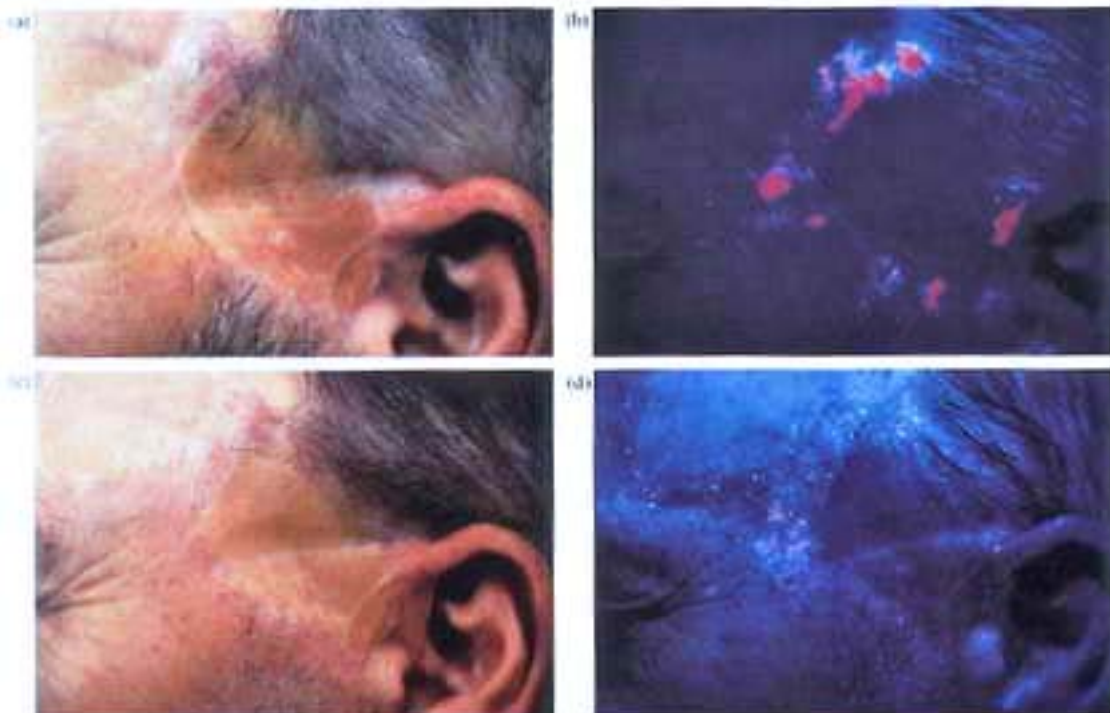


Fig. 51 : application de la fluorescence à la détection de tumeurs. a) le patient a déjà subi une intervention chirurgicale suivie d'une greffe de peau. A l'œil nu, on peut remarquer la présence de tissu tumoral au niveau des zones d'eczéma. b) Traitement par l'ALA (20%, 6h, excitation à 370-405 nm) montrant la fluorescence rouge caractéristique des porphyrines en 6 zones différentes. c) Neuf mois après traitement chirurgical guidé par les indications de la fluorescence. On ne remarque plus de tissu tumoral. d) La fluorescence confirme l'absence de tumeur.

b) Utilisation de la fluorescence pour l'étude du photobleaching

En chimie, le terme « photobleaching » se rapporte à la diminution de l'absorbance et/ou de la fluorescence d'un composé exposé à la lumière.

Ainsi le ternissement progressif de nos meubles de jardin (colorés bien sur) est dû à ce phénomène.

Il s'agit d'un domaine important de la chimie des colorants et les Romains rapportaient déjà le ternissement de textiles colorés exposés à la lumière. Mais si le sujet est étudié depuis plusieurs siècles, les mécanismes de cette photodégradation ne sont pas encore totalement élucidés.

L'intérêt de la photodégradation en PDT est la destruction du photosensibilisateur résiduel après le traitement de façon à limiter la photosensibilité. Ainsi l'emploi d'un Ps capable de subir une photodégradation contrôlée serait une avancée pour les patients puisque l'irradiation thérapeutique de la zone à traiter détruirait la tumeur tout en initiant le phénomène de dégradation du Ps.

Il ne faut cependant pas que le sensibilisateur soit susceptible de subir une trop forte dégradation lors de l'irradiation, les produits ainsi formés n'étant pas forcément doués des mêmes propriétés phototoxiques.

Ainsi, lors de l'irradiation, la *m*-THPC (**Foscan®**) se dégrade avec une perte notable de l'absorbance (notamment pour la bande 650 nm utilisée en thérapie) :

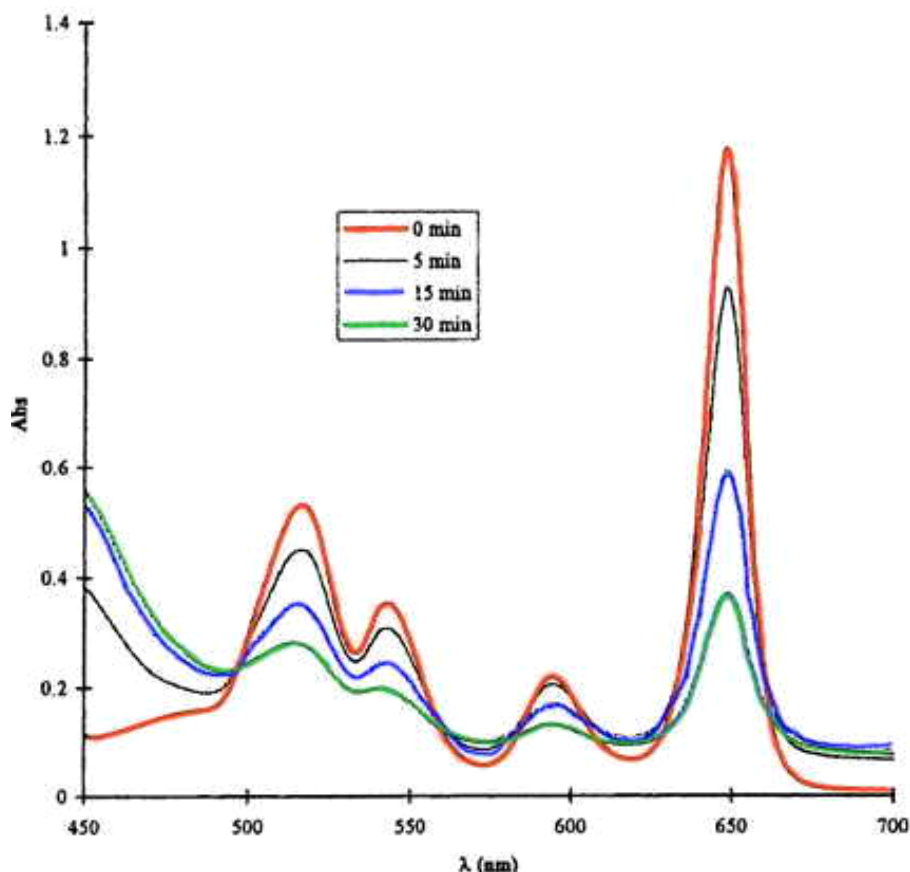


Fig. 52 : changement du spectre d'absorption de la *m*-THPC dans un mélange méthanol/eau (3/2) lors d'une irradiation à 514 nm.

Il existe deux types de photobleaching :

- la photomodification où le Ps se trouve dans une structure modifiée de celle d'origine, avec une perte d'absorbance et/ou de phosphorescence.
- la photodégradation pure où le Ps est clivé en molécules de petites tailles ne présentant pas d'absorption notable dans le domaine de la lumière visible.

La photodégradation peut être réalisée soit par l'oxygène singulet, soit par l'attaque de composés tissulaires dans un état excité (les réactions de type I formant des radicaux ou des produits ioniques).

Notons que les produits de dégradation peuvent être assez nombreux comme le montre le schéma suivant :

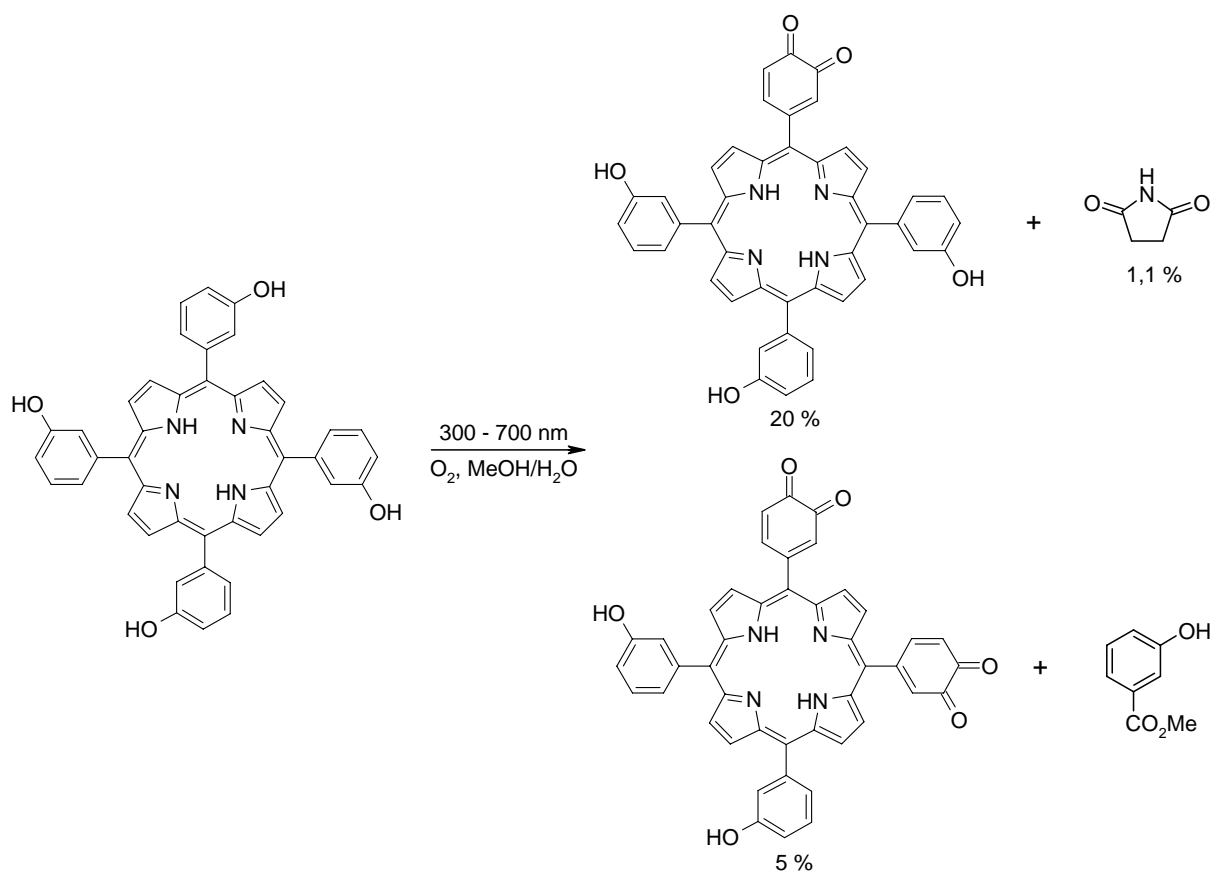


Fig. 53 : photooxydation de la m-THPP dans le méthanol. Les produits de dégradations sont moins fluorescents que la porphyrine initiale.

L'intensité de la fluorescence étant proportionnel à la concentration en photosensibilisateur intact, la mesure de la photodégradation estimée par la diminution de la fluorescence permet de contrôler le traitement en temps réel.

III. Conclusion

Nous voyons ici que la thérapie photodynamique PDT est une technique originale et prometteuse de traitement de certains cancers accessibles à la lumière et d'autres maladies (DMLA, psoriasis...) sans présenter les inconvénients des autres traitements.

Elle peut donc venir en remplacement ou complément des traitements plus classiques.

Elle est basée sur la combinaison d'une molécule photosensibilisante (Ps) et de lumière.

Pris séparément, ces deux facteurs n'ont aucun effet sur l'organisme, mais lorsqu'ils sont combinés entre eux en présence d'oxygène, il y a formation d'espèces cytotoxiques létales pour les cellules tumorales ayant absorbé le Ps.

Cette méthode, qui permet une grande sélectivité, est le résultat de deux facteurs :

- la concentration préférentielle du photosensibilisateur dans les tissus à division rapide
- la possibilité de restreindre l'irradiation lumineuse à une zone précise.

C'est donc une technique en développement qui présente déjà des résultats très encourageants permettant d'améliorer la prise en charge de certaines maladies graves.

Cependant, des progrès restent encore à accomplir, notamment pour améliorer la sélectivité de ces molécules et augmenter leur vitesse d'élimination du corps humain.

IV. Bibliographie

- Jablonski, A. ; *Nature*, 131 (1933) 839-840
- Poulin L., Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval pour l'obtention du grade de maître ès sciences en biochimie, 2005
- Pablo Fuentes-Prior P., Salvesn G.S. ; *Biochem. J.*, 384 (2000) 201-232
- Fraolini-Robréau A.N. ; Thèse de doctorat de biologie cellulaire et moléculaire : Contribution à l'étude des bases moléculaires des porphyries hépatiques aiguës et de la protoporphyrine érythropoïétique, 2002
- Varamo M., Thèse de chimie organique : Stratégies de synthèses de macrocycles tétrapyrroliques *méso*-substitués dissymétriques : application en thérapie photodynamique, 2005, Faculté des Sciences Orsay.
- Croisy A., Lucas B., Maillard P. ; Les macrocycles tétrapyrroliques glucoconjugués. Utilisation en photothérapie dynamique, *Actualités de Chimie Thérapeutiques – 31^e série*, 181-244, 2005.
- Bonnett R. ; *Chemical aspects of photodynamic therapy*, Gordon and Breach Science Publishers, 2000
- Scheinder R., Schmitt F., Frochot C. ; *Bioorg. Med. Chem.*, 13 (2005) 2799-2808
- Swamy N., James D.A. ; *Bioorg. Med. Chem.*, 10 (2002) 3237-3243
- Gauyacq D. ; *Cours de spectroscopies optiques*, Orsay, 2005
- Mahy J.P., Clivio P. ; *Cours de chimie des nucléosides*, Orsay, 2005
- Lucas B., Thèse de chimie organique : Désymétrisation de porphyrines susceptibles d'application en photothérapie dynamique, à l'aide de la chimie sur support solide, 2004, Faculté des Sciences Orsay.
- Patrice T., *Photodynamic therapy*, 2003, RSC.
- Bonnett R., Martinez G. ; *Tetrahedron*, 57 (2001) 9513-9547

- http://www.fnclcc.fr/fr/patients/dico/definition.php?id_definition=574
- <http://www.vulgaris-medical.com/encyclopedie/necrose-3187.html>
- <http://fr.wikipedia.org/wiki/Caspase>
- <http://opm.phar.umich.edu/protein.php?pdbid=1nme>
- http://www.doctissimo.fr/html/sante/encyclopedie/sa_1264_psoriasis.htm
- <http://christian.pourre.free.fr/photosflore.htm>
- <http://www.stlukeseye.com/Conditions/MacularDegeneration.asp#s>
- <http://www.nature.com/emboj/journal/v19/n22/full/7593408a.html>
- http://www.curie.fr/recherche/themes/detail_equipe.cfm/lang/_fr/id_equipe/65.htm
- <http://www.curie.u-psud.fr/U759/rapportequipe2.html>
- http://en.wikipedia.org/wiki/Shiga_toxin
- <http://www.catie.ca/feuilles.nsf/b95224062c09b77985256864005dd4ad/059820561b239d54852567d30050ef65?OpenDocument>