

Mécanismes photochimiques d'intérêts biologique et médical

Daniel Brault
Directeur de Recherche au CNRS



EVRY, France



INTRODUCTION

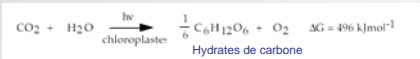
Réactions photochimiques

Au cœur de la vie et sources d'applications très nombreuses

Les réactions photochimiques sont d'une importance fondamentale dans l'origine et la préservation de la vie

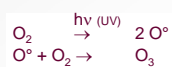
Photobiologie

➤ Photosynthèse



- Vision
- Phototropisme
-

➤ Couche d'ozone stratosphérique (filtre UV)



Applications des réactions photochimiques

➤ Chimie

- ✓ Synthèse organique « fine »
- ✓ Réactions en chaînes initiées par la lumière:
- ✓ Photo-halogénéation, photo-polymérisation
- ✓ Photographie
- ✓ Photo-lithographie (imprimerie offset, production de circuit imprimés, ...)

➤ Biologie moléculaire

➤ Médecine

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

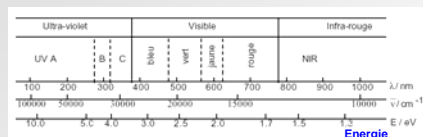
1^{ère} Partie

Absorption de lumière

- ✓ Etats excités électroniques
- ✓ Réactivité photochimique

Loi fondamentale

Loi de Grotthus-Draper : seule une radiation lumineuse absorbée par un système peut initier une réaction photochimique



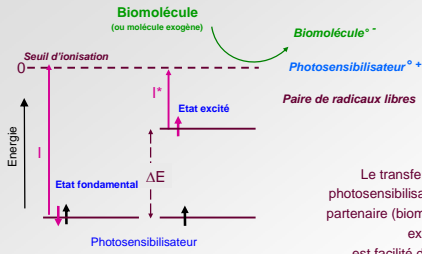
Domaine efficace de longueur d'onde

Cependant, une réaction chimique impliquant des ruptures et/ou des réorganisations de liaisons, l'énergie doit être suffisante

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Mécanismes de photosensibilisation
Type I : Transfert d'électron

Réduction

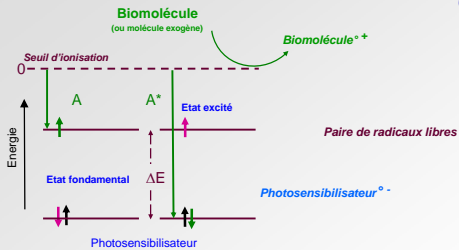


Le transfert d'électron du photosensibilisateur excité vers son partenaire (biomolécule ou molécule exogène) est facilité d'une énergie ΔE correspondant à l'énergie de l'état triplet

Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

Mécanismes de photosensibilisation
Type I : Transfert d'électron

Oxydation



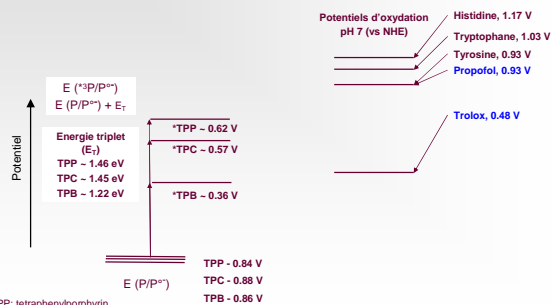
Le gain d'énergie lors du transfert d'électron d'une biomolécule (ou molécule exogène) vers le photosensibilisateur excité est accru d'une énergie ΔE correspondant à l'énergie de l'état triplet

Les propriétés d'oxydo-réduction d'une molécule à l'état excité sont exaltées par rapport à celles présentées à l'état fondamental

Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

Pouvoir oxydant de photosensibilisateurs à l'état excité : Potentiels redox

Pour oxyder un partenaire le photosensibilisateur doit avoir un potentiel redox ($P/P^{•+}$) supérieur à celui-ci



TPP: tetraphénylporphyrin
 TPC: tetraphénylchlorin
 TPB: tetraphénylbacteriochlorin

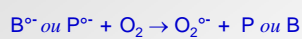
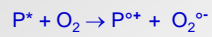
Atelier de Biophotonique 2010 Genopoles

Un partenaire : l'oxygène

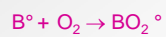
Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Mécanismes de photosensibilisation : Type I Rôle de l'oxygène

Formation d'ion superoxide

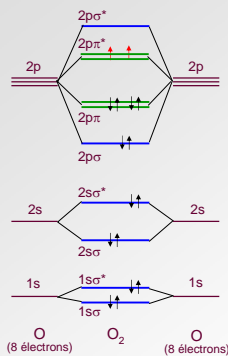


Formation d'oxyradicaux



Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

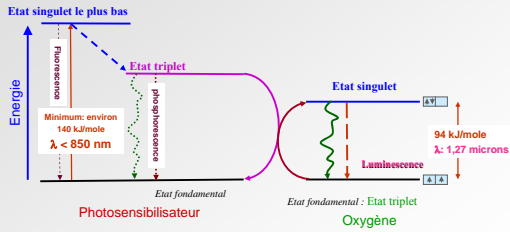
Oxygène : Une molécule aux propriétés très particulières



*A l'état fondamental
l'oxygène moléculaire
existe sous la forme
d'un état triplet*

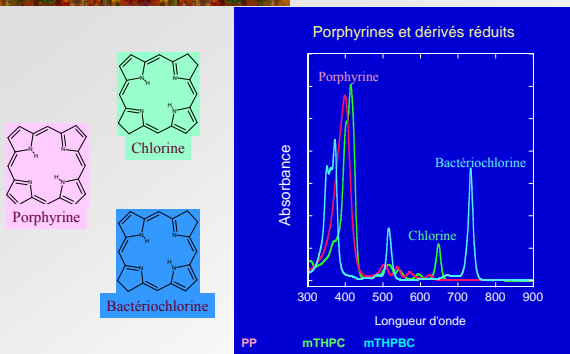
Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Mécanismes de photosensibilisation : Type II
Production d'oxygène singlet



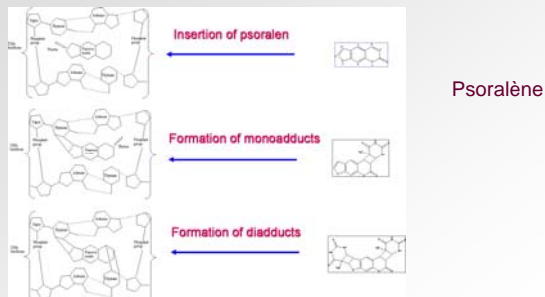
Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

Photosensibilisateurs : Principales familles
Spectres d'absorption



Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

Mécanismes de photosensibilisation : Photoaddition



Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

Processus de photosensibilisation: Rayon d'action

Distance entre le photosensibilisateur et sa cible

- Type I, transfert d'électron : contact ou très proche
 - Photoaddition: contact
 - Type II, Oxygène singulet
- Estimation:
Temps de vie en milieu biologique ~ 0.1 μ s
• Diffusion ~ 20 nm

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Mesures quantitatives en photophysique et photochimie

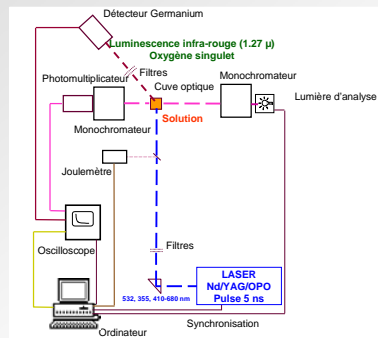
- *Photolyse impulsionnelle par éclair laser*
 - ✓ Analyse temporelle
- *Irradiation continue*
 - ✓ Analyse des produits formés

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Méthodes d'études des états transitoires Photolyse par éclair laser - nanoseconde

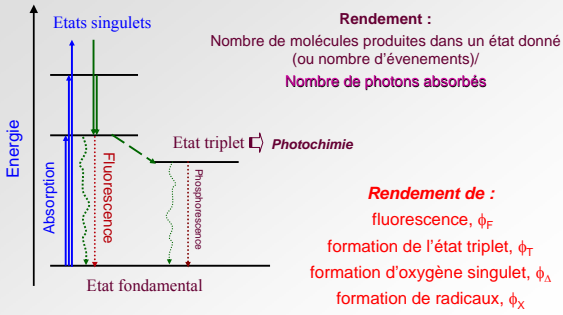
Phénomènes photoinduits
Echelle de temps 10^{-8} - 1 s

Montage « classique » de spectrophotométrie



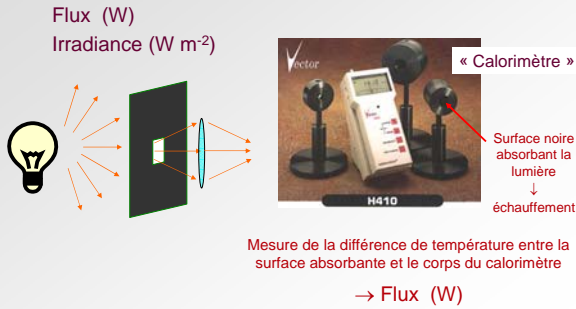
Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Notion de rendement en photophysique et en photochimie



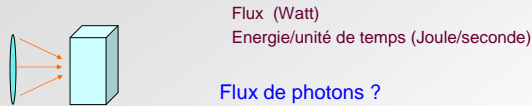
Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

**Mesure de rendements quantiques :
 Calcul du nombre de photons absorbés**



Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

**Calcul du nombre de photons incidents
 Lumière monochromatique, λ (nm)**



Energie d'un photon $E_{\text{photon}} : h \nu = h c / \lambda$ (loi d'Einstein)*

h : constante de Planck = 6.626×10^{-34} Joule x seconde
 ν : fréquence de la lumière de longueur d'onde λ
 c : vitesse de la lumière = 2.998×10^8 mètre/seconde

* Exemple : à 400 nm, l'énergie d'un photon est : $6.626 \times 10^{-34} \times 2.998 \times 10^8 / (400 \times 10^{-9}) = 4.97 \times 10^{-19}$ J

Nombre de photons par seconde : Flux (Watt) / E_{photon} (Joule)

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Loi de Beer Lambert : Intensité lumineuse absorbée

Intensité absorbée

$$dI = -k I_0 C dl$$

k facteur de proportionnalité dépendant de la longueur d'onde considérée

$$dI = -k I_0 C dl \quad \text{ou} \quad dI/I_0 = -k C dl$$

En intégrant sur le parcours l

$$\ln I = -k C l + \text{Constante} \quad \text{Pour } l=0, \text{ Constante} = \ln I_0$$

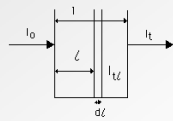
$$\ln (I_0 / I) = k C l \quad \text{ou} \quad \log (I_0 / I) = k C l / 2,3$$

ϵ = coefficient d'extinction molaire = $k/2,3$

$$\text{Absorbance} = \text{Abs} = \log (I_0 / I) = \epsilon C l$$

$$I = I_0 e^{-2,3 \epsilon C l} \quad I = I_0 e^{-2,3 \text{ Abs}}$$

$$I_a = I_0 - I = I_0 (1 - e^{-2,3 \text{ Abs}})$$



Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Loi de Beer Lambert : Intensité lumineuse absorbée

Relation générale (une seule espèce absorbante)

$$I_a = I_0 (1 - e^{-2,3 \text{ Abs}})$$

Cas particulier : solutions diluées

Absorbance faible ($1 - e^{-2,3 \text{ Abs}} \approx 2,3 \text{ Abs}$)

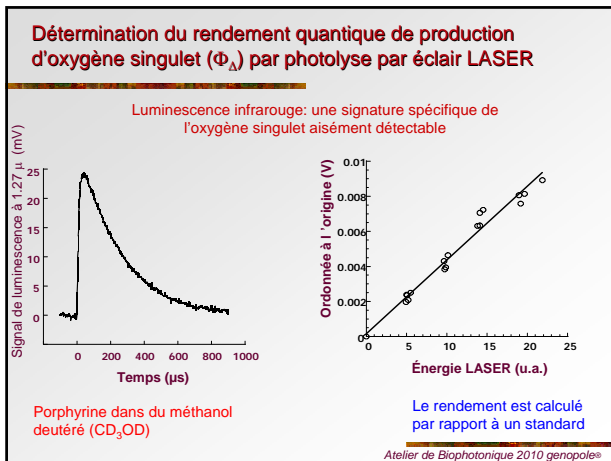
(l'expression $e^x \rightarrow 1 + x$ quand $x \rightarrow 0$)

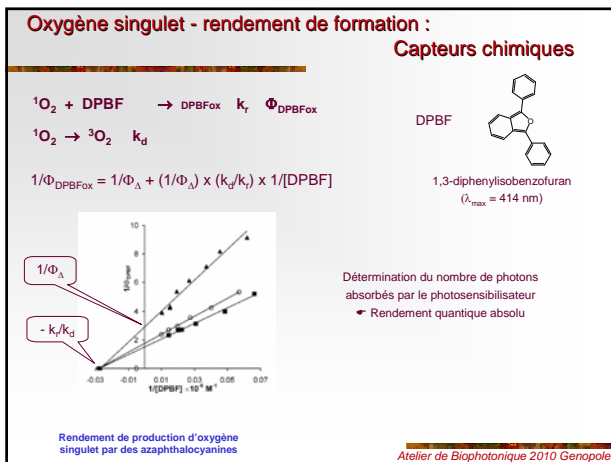
$$I_a = 2,3 I_0 \text{ Abs}$$

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Rendement de production d'oxygène singulet

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®





Rendements quantiques

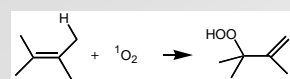
Classe de photosensibilisateur	Rendement triplet (Φ_T)	Rendement oxygène singulet (Φ_{Δ})
Porphyrine	0.7 – 0.85	0.55 – 0.75
Chlorine	0.7 – 0.85	0.55 – 0.75
Bactériochlorine	0.3 – 0.75	0.3 – 0.5
Phtalocyanine	0.5 – 0.4	0.3 – 0.4

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Réactivité des états excités et cibles biochimiques des espèces activées de l'oxygène

Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

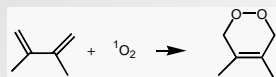
Réactions de l'oxygène singlet avec les diènes



réaction « ene »



Formation de dioxétane

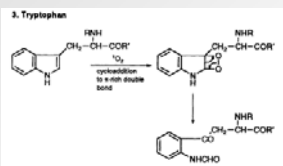
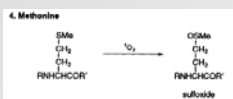


Cycloaddition

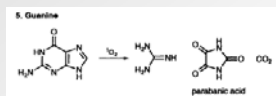
Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

Exemples de réactions de l'oxygène singlet avec des biomolécules

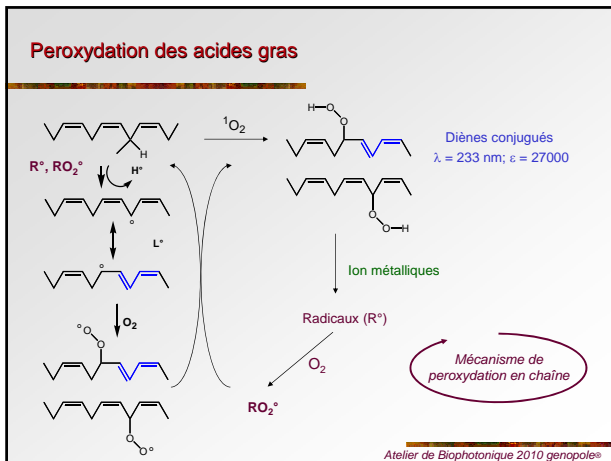
Acides aminés

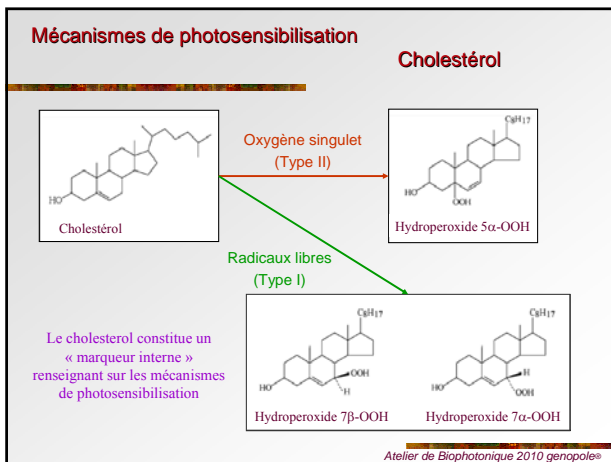


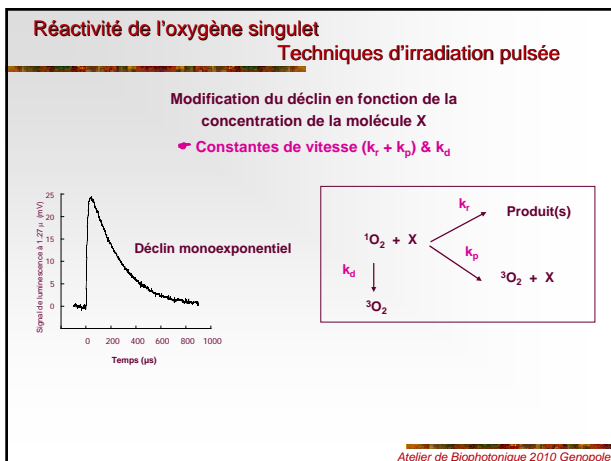
Bases nucléiques



Atelier de Biophotonique 2010 genopoles



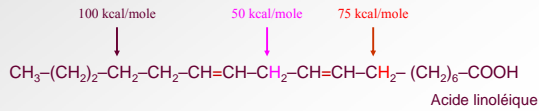
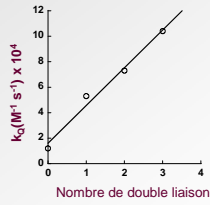




Réactivité de l'oxygène singlet

Constante de vitesse de « quenching » (k_Q) de l'oxygène singlet par des acides gras insaturés

k_Q : Désactivation physique
+
Réaction chimique



Atelier de Biophotonique 2010 genopoles®

Constantes de vitesse de « quenching » de l'oxygène singlet par des biomolécules

Cibles biologiques

MOLECULE	CONSTANTE DE VITESSE ($M^{-1} s^{-1}$)
ACIDES GRAS INSATURES	$(5 - 10) \times 10^4$
CHOLESTEROL	5.7×10^4
HISTIDINE	4.4×10^7
TRYPTOPHANE	5.6×10^7
CYSTEINE	8.9×10^6
METHIONINE	1.4×10^7

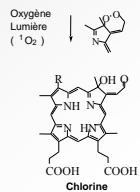
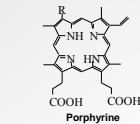
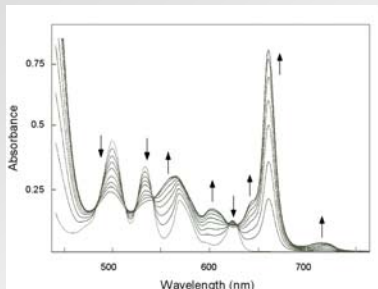
Photosensibilisateur
 ↪ Photodégradation

PORPHYRINES VINyliQUES	$\approx 1 - 3 \times 10^7$
PORPHYRINES NON-VINyliQUES	$\approx 1 \times 10^6$

Atelier de Biophotonique 2010 genopoles®

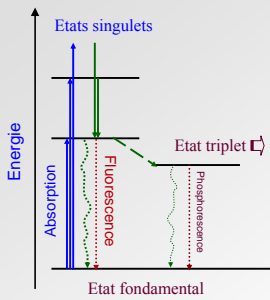
Auto-dégradation (photobleaching) ou auto-transformation de photosensibilisateurs

Exemple de photo-transformation d'une porphyrine vinylique



Atelier de Biophotonique 2010 genopoles®

Mécanismes de photosensibilisation



Les rendements quantiques de formation d'état triplet et d'oxygène singulet déterminent en premier lieu les qualités d'un photosensibilisateur

Intrinsèquement, l'énergie des photons absorbés n'a pas d'importance (dans la limite des processus considérés)

Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

2^{ème} partie

Applications des processus photochimiques

Nouvelles techniques en biologie moléculaire

Applications médicales

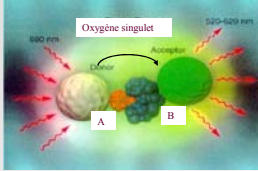
Photothérapies

Photochimiothérapies

Thérapie photodynamique (PDT)

**Oxygène singulet :
Une sonde des interactions entre biomolécules**

**Technique AlphaScreen™
(Packard BioScience).**



Les biomolécules sont conjuguées avec des perles (beads) contenant d'une part un photosensibilisateur (donneur conjugué à la biomolécule A) et, d'autre part, à un réactif de l'oxygène singulet (accepteur conjugué à la biomolécule B) qui émet un signal de fluorescence. Cette fluorescence est la signature de l'interaction entre les biomolécules. L'oxygène singulet agit ici comme « indicateur de proximité ».

Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

Photo-pontage

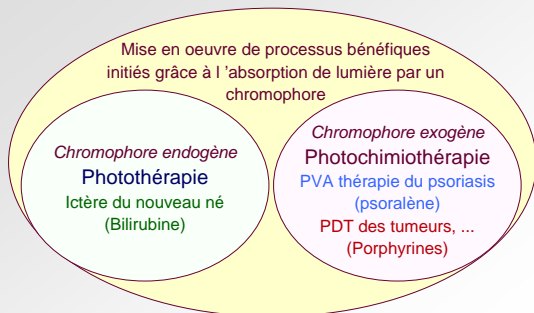
Caractérisation des interactions entre biomolécules

- Irradiation lumineuse (ultraviolet)
- Excitation directe des biomolécules (bases nucléiques, ...)
- Formation de liaison chimique entre biomolécules en contact

Analyse par électrophorèse, spectrométrie de masse, ...

Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

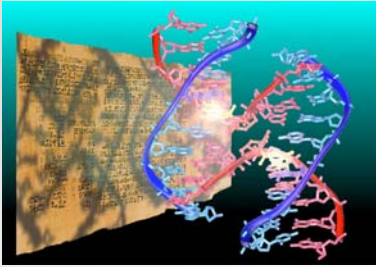
La photomédecine



Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

Photochimiothérapie :

Une vieille histoire encore d'actualité



Psoralen is one of the oldest known chemotherapeutic drugs--the use of a psoralen containing Nile weed to treat skin ailments was described in Ebers papyrus, an early Egyptian medical text published around 1550 BC (the front page is reproduced here). The drug photocrosslinks DNA and is shown in this figure to induce the formation of a four-stranded junction. (Eichman, *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 2001, **308**: 15-26).

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

La photomédecine



Photothérapie de l'ictère du nouveau-né



PVA thérapie du psoriasis

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Action biologique de la lumière

Effet photodynamique

Effet photodynamique : Inactivation de systèmes vivants

Paramécies, colorant : acridine

1900 - 1904

Oscard Rabb, Hermann von Tappeiner (Munich)

- Lumière
- Photosensibilisateur
- Oxygène

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

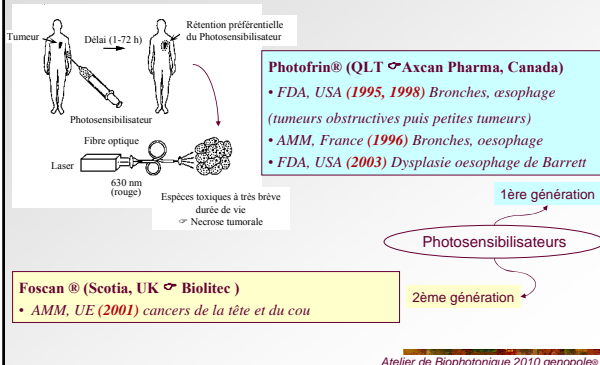
Photochimiothérapie antitumorale

Historique

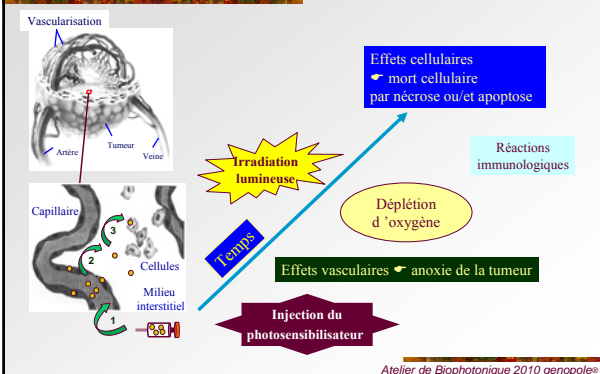
- > **1942 – 1948 Auler & Banzer; Figge *et al.***
Observations de rétention de porphyrines par des tumeurs ou des tissus prolifératifs et possibilités de traitement
- > **1955, 1960 – 1967 Schwartz; Lipson *et al.***
Préparation de l'hématoporphyrine dérivée (HpD) présentant une rétention marquée par les tumeurs (observée par fluorescence)
- > **1960 - 1993 Lipson; Gregoire; Profio; ..**
Travaux privilégiant le photodiagnostic grâce à la fluorescence des porphyrines puis le développement de l'endoscopie
- > **1972- 1977 Diamond; Dougherty; Kelly**
Intérêt de la photochimiothérapie des tumeurs démontré sur l'animal (hematoporphyrine, HpD)
- > **1978 Dougherty**
Première étude clinique importante en photochimiothérapie des tumeurs (HpD)

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Photochimiothérapie antitumorale

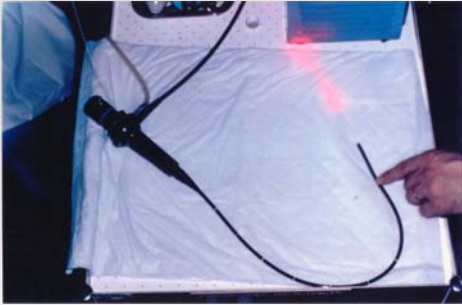


Mécanismes d'action en photochimiothérapie antitumorale



Photochimiothérapie antitumorale

Traitement endoscopique



Intérêt majeur des lasers :
Efficacité de couplage à une fibre optique

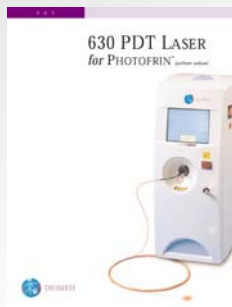
Hopital Foch,
Suresnes
Traitement de tumeur bronchique

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Photochimiothérapie antitumorale

Laser à diode

- SPECIFICATIONS**
- Laser Type InGaAsP Laser Diode, CW
 - Wavelength 630nm ± 3 nm
 - Delivery fiber OPTIGUIDE® fiber optic delivery system
 - Power 2000mW maximum calibrated power output to fiber tip
 - Cooling Forced air
 - Power Supply 115 VAC ±10%, 60 Hz < 10A, single phase
 - Dimensions 485 mm (h) x 220 mm (w) x 405 mm (d) nominal - not including cartide.
 - Weight 19.5kg (43lbs) nominal



Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Applications en photochimiothérapie

Affections cutanées

- Systèmes d'illumination « conventionnels »
- Lampes ou réseaux de diodes luminescentes



Aktillite® CL16
By Photocure ASA

The Aktillite CL16 lamp emits red light and is intended for use in topical photodynamic therapy (PDT) of skin lesions in combination with Metvix® cream. The lamp illuminates areas up to 40 x 50 mm.

Performance

Irradiance of approximately 50 mW/cm² at 50 mm distance and an average wavelength of approx. 630 nm. The full width at half maximum (FWHM) of emission spectrum is about 18 nm.

Maximum irradiance variation over the target area is ± 10%.

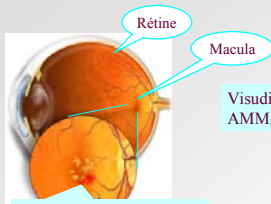
Dosage can be set manually, but the default is 37 J/cm²

Normal illumination time 8 – 10 minutes

➢ <http://www.photocure.com/>

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Applications en photochimiothérapie
Dégénérescence Maculaire Liée à l'Age (DMLA)



Visudine® (QLT & Novartis)
 AMM, niveau mondial (2000) DMLA « humide »

Dégénérescence maculaire
 (Prolifération vasculaire)

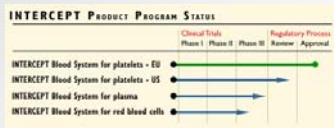
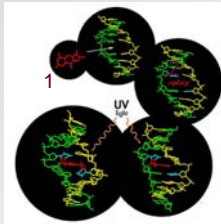


Remboursement en France

Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

Photochimiothérapies: autres applications

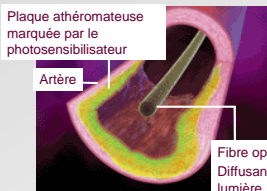
➤ Décontamination virale et bactérienne d'éléments sanguins
 (plaquettes, approuvé par l'UE, Cerus/Baxter, USA)



➤ Traitement de plasma par le bleu de méthylène (Belgique)

Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

Photochimiothérapies: autres applications potentielles
Photoangioplastie laser



➤ Photoangioplastie: traitement
 d'athérome ou de resténose
 (essais cliniques phase 1,
 Pharmacyclics, USA)

Fibre diffusante souple
 Cardiofocus, USA



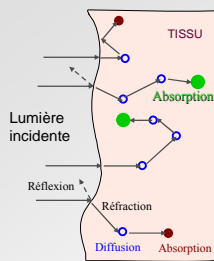
Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

Photosensibilisateurs

Structure et propriétés

Exigences en photochimiothérapie

Paramètre fondamental en photochimiothérapie Transmission de la lumière

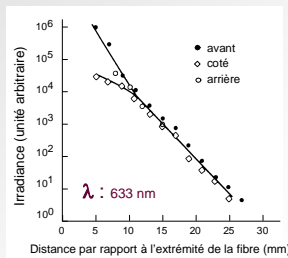
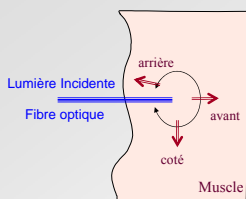


Seule la lumière absorbée par le photosensibilisateur est efficace

- Particule diffusante
- Chromophore endogène
- Photosensibilisateur

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Paramètre fondamental en photochimiothérapie Transmission de la lumière



Dougherty, 1984

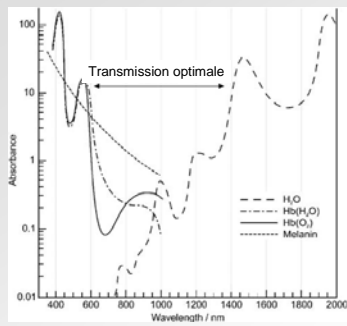
Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

**Transmission de la lumière par les tissus :
Le rouge est mieux transmis**



Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Transmission de la lumière par les tissus : Fenêtre optimale

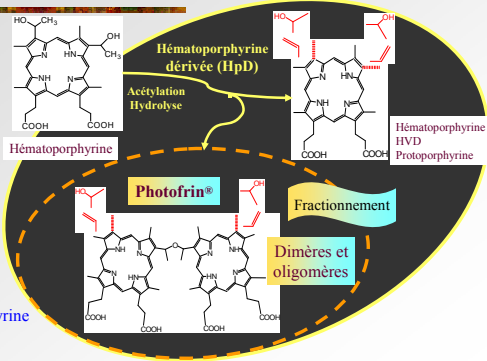


Fenêtre optimale d'excitation de photosensibilisateurs :
620 à 800 nm

- ✓ Transmission de la lumière par les tissus
- ✓ Energie minimale pour produire de l'oxygène singulet ou des radicaux

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Photosensibilisateurs : 1^{ère} génération (AMM)

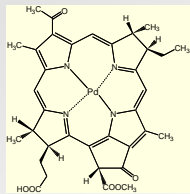


Photofrin®
QLT, AXCAN
Classe : Porphyrine

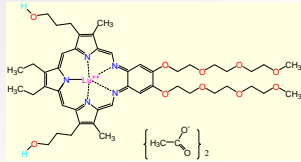
Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Photosensibilisateurs : 2^{ème} génération

Bactériochlorophylle de Palladium
Tookad (Steba Biotech)

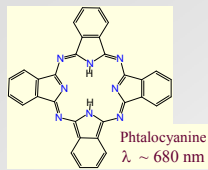


Motexafin Lutetium® (Lu-Texaphyrine)
(Pharmacyclics)

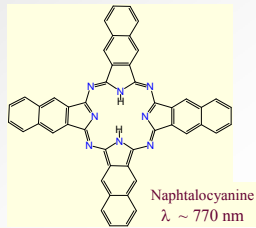
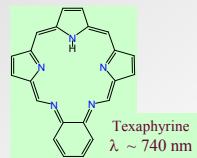


Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Photosensibilisateurs : Macrocycles étendus



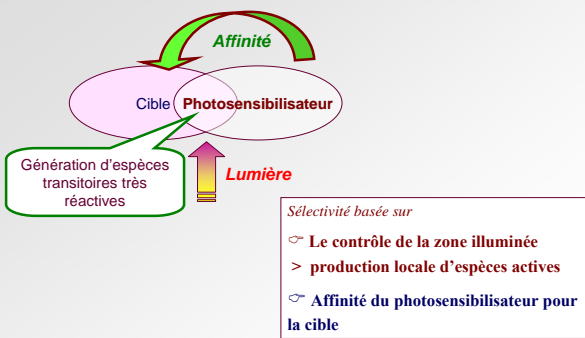
Composés synthétiques
Absorption dans le rouge lointain



Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Photochimiothérapie :

Action sélective



Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Dosimétrie

$$\text{Dose} = f(\epsilon_{\lambda}, C_t, E_t, \Phi_{\Delta}, t)$$

Annotations:
- ϵ_{λ} : Coefficient d'extinction molaire
- C_t : Concentration du photosensibilisateur
- E_t : Irradiance
- Φ_{Δ} : Rendement en espèces actives
- t : Temps

E = irradiance : puissance par unité de surface (Watt/cm²)

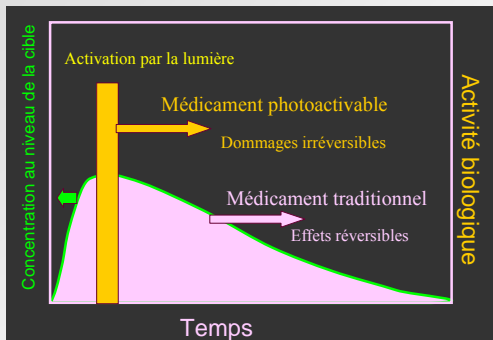
E x t = Fluence : énergie par unité de surface (Joule/cm²)

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Pharmacocinétique

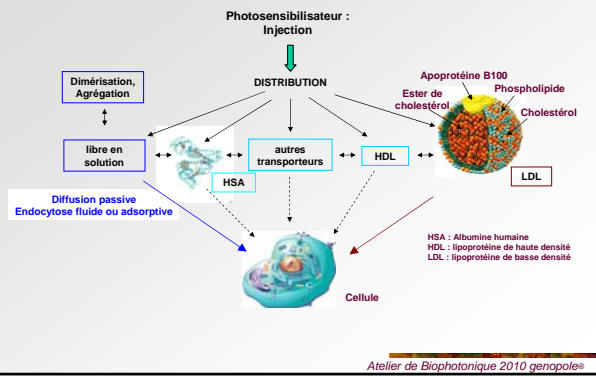
Mécanismes de sélectivité tumorale

Médicaments photoactivables : Importance de la pharmacocinétique

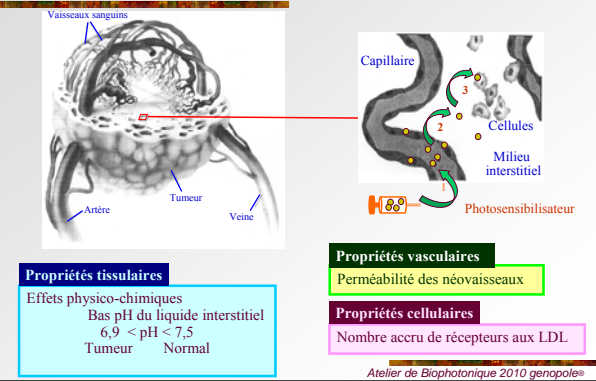


Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

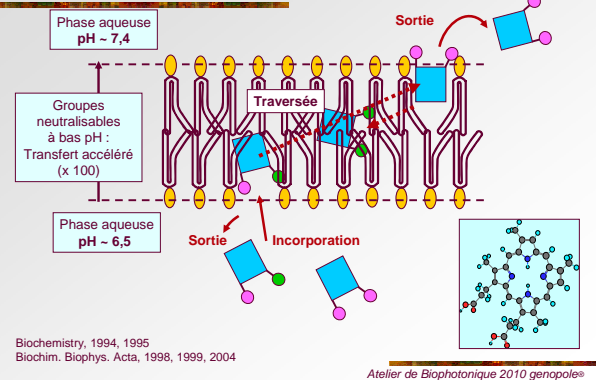
Déterminants physicochimiques de l'incorporation et de la distribution cellulaire de photosensibilisateurs



Mécanismes de rétention de photosensibilisateurs par les cellules tumorales

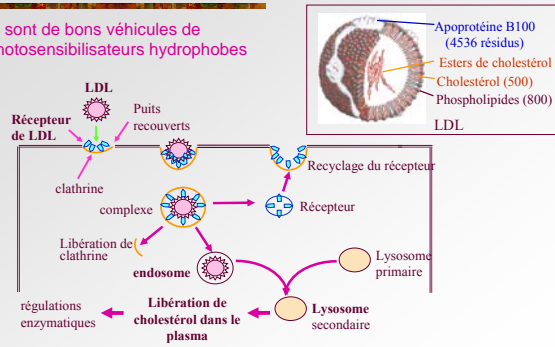


Porphyrines dicarboxyliques : Effet du pH sur les interactions avec les membranes



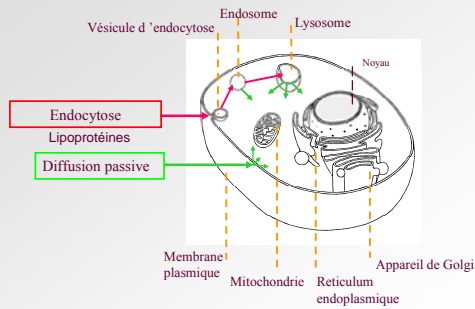
Les lipoprotéines de basse densité (LDL) assure l'apport de cholestérol aux cellules

et sont de bons véhicules de photosensibilisateurs hydrophobes



Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

Incorporation et localisation subcellulaire



Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

Dynamique d'interactions de photosensibilisateurs avec des membranes - localisation sub-cellulaire

DP + LDL

Fibroblastes HS68

- + Affinité pour les membranes modèles
- + Affinité pour les LDL
- + Cinétique d'interactions avec les LDL
- Transfert à travers les bicouches lipidiques

AIPcS₂ + LDL

● AIPcS₂ ● Lyso-tracker green ● Colocalisation

Atelier de Biophotonique 2010 genopoles

Photosensibilisateurs :

Génération futures ?

Objectif : **Augmenter la sélectivité des photosensibilisateurs envers les tumeurs en utilisant certaines de leurs caractéristiques**

Surexpression de récepteurs par les cellules tumorales

- ✓ Acide folique
- ✓ Œstrogène
- ✓ Sucres

Couplage de photosensibilisateurs à des molécules ciblées vers ces récepteurs

Surexpression de protéases par les tumeurs ou de certaines macromolécules (ARNm)

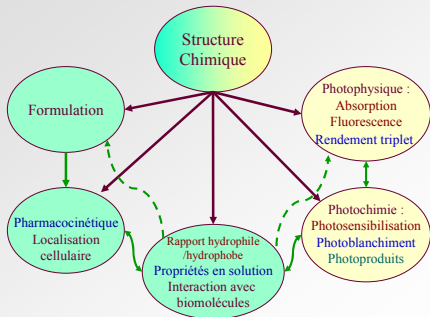
Systèmes dont les propriétés photosensibilisatrices sont « révélées » par l'action de ces protéases ou par l'interaction avec les macromolécules

Transport et vectorisation de photosensibilisateurs par des nanoparticules

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Développement de photosensibilisateurs

Une association de propriétés



Atelier de Biophotonique 2010 genopole®

Conclusion

Spectroscopies optiques

- > Moyens d'analyse sensibles adaptés aux études statiques et dynamiques
 - > Lumière peut induire des processus photochimiques
- Sources de nombreuses applications (*mais aussi d'artéfacts*)

Atelier de Biophotonique 2010 genopole®
