HAL
open science

Thérapie photodynamique ciblant la vascularisation tumorale par l'adressage du co-récepteur neuropiline-1 : Vers l'élaboration de peptides biologiquement plus stables

Noémie Thomas

To cite this version:

Noémie Thomas. Thérapie photodynamique ciblant la vascularisation tumorale par l'adressage du co-récepteur neuropiline-1 : Vers l'élaboration de peptides biologiquement plus stables. Biologie cellulaire. Université Henri Poincaré - Nancy 1, 2009. Français. NNT : 2009NAN10019 . tel-01748489

HAL Id: tel-01748489

https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748489v1

Submitted on 29 Mar 2018

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 LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITE HENRI POINCARE – NANCY I
Ecole doctorale « Biologie Santé environnement »

THESE

Pour obtenir le titre de

Docteur de l'Université Henri Poincaré – Nancy I

Discipline : **Ingénierie Cellulaire et Tissulaire**

Noémie THOMAS

Thérapie photodynamique ciblant la vascularisation tumorale par l'adressage du co-récepteur neuropiline-1 : Vers l'élaboration de peptides biologiquement plus stables

Thèse présentée et soutenue publiquement le 30 janvier 2009

Rapporteurs

Serge MORDON	Directeur de Recherche INSERM, Lille	
Vincent SOL	Maître de Conférences (HdR), Limoges	*Non examinateur*

Examinateurs

Muriel BARBERI-HEYOB	Chargée de Recherche CAV (HdR), Nancy	*Directeur de thèse*
Céline FROCHOT	Chargée de Recherche CNRS (HdR), Nancy	*Co-directeur de thèse*
Stéphanie BONNEAU	Maître de Conférences, Paris 6	
Pierre LEROY	Professeur, Nancy	
Olivier TILLEMENT	Professeur, Lyon 1	

Invité

Régis VANDERESSE	Chargé de Recherche CNRS, Nancy

CENTRE DE RECHERCHE EN AUTOMATIQUE DE NANCY
CNRS – CENTRE ALEXIS VAUTRIN – NANCY UNIVERSITE

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Centre de Recherche en Automatique de Nancy (Directeur Alain Richard), sur le site du Centre Alexis Vautrin (Directeur François Guillemin) et a été soutenu financièrement par la Ligue Nationale Contre le Cancer.

Madame le Docteur Muriel Barberi-Heyob, *je vous remercie pour m'avoir encadré, soutenu et aiguillé tout au long cette thèse. Un grand merci pour votre patience et votre grande disponibilité ainsi que vos qualités humaines et scientifiques.*

Madame le Docteur Céline Frochot, j*e te remercie de m'avoir guidé dans cette voie et fait partager ta passion pour la recherche. Un grand merci pour ton soutien et ton encadrement tout au long de cette thèse jusqu'au stade de la rédaction.*

Monsieur le Professeur Serge Mordon et monsieur le docteur Vincent Sol*, je vous adresse mes sincères remerciements pour l'honneur que vous me faites en acceptant de juger ce travail en tant que rapporteurs. Je vous prie de croire en ma haute considération.*

Messieurs les Professeurs Pierre Leroy et Olivier Tillement, madame le docteur Stéphanie Bonneau, *je vous suis profondément reconnaissante pour l'enthousiasme avec lequel vous avez accepté de participer à ce jury de thèse.*

Monsieur le Docteur Régis Vanderesse, *un très grand merci pour ton accueil chaleureux au LCPM et le temps que tu m'as consacré depuis mon initiation à la synthèse peptidique jusqu'à l'analyse des spectres RMN et les corrections de ce manuscrits. C'est un plaisir de travailler avec toi.*

Je remercie également tous les membres du LCPM pour leur chaleureux accueil, en particulier Mathilde et Ezatul.

Madame le Docteur Marie-Laure Viriot*, je vous remercie pour avoir soutenu et suivi ce travail avec beaucoup d'attention.*

Mademoiselle le Docteur Loraine Tirand*, tes connaissances et ta rigueur scientifique ont été un modèle pour moi. Merci pour la qualité de ton travail dont une partie est présentée dans*

ce mémoire. Grâce à toi, cette thèse a pu se déroulée dans les meilleures conditions. Un grand merci aussi pour ton soutien tout au long de cette thèse.

***Mademoiselle Denise Béchet**, un grand merci pour la qualité du travail que tu as fourni durant ton master 2 (et après), les résultats d'efficacité photodynamique in vivo t'appartiennent. Je te remercie amicalement pour ton soutien moral surtout durant cette dernière année de thèse, j'ai été ravie de pouvoir travailler avec toi. Bon courage pour la suite de ta thèse !*

***Monsieur le Professeur Philippe Bécuwe,** je vous suis sincèrement reconnaissante de m'avoir transmis vos connaissances en biologie moléculaire. Je vous remercie chaleureusement pour votre disponibilité et votre enthousiasme, grâce à vous le projet de modèle cellulaire à pu voir le jour.*
Je remercie également Vanessa et Emilie pour leur aide technique et leur sympathie.

***Monsieur le Professeur François Plénat,** je vous suis profondément reconnaissante de m'avoir permis de travailler au sein de votre laboratoire. Je vous remercie pour votre expertise et le temps conséquent consacré à l'analyse de mes tumeurs.*
Je tiens également à adresser mes remerciements à Madame Corinne Bonnet pour m'avoir initiée aux techniques d'immunohistochimie.

***Monsieur le Professeur Etienne Chatelut**, je vous remercie chaleureusement pour votre expertise en pharmacocinétique.*

***L'équipe du Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser de Metz,** je vous remercie pour cette collaboration efficace. Mes remerciements s'adressent en particulier au Docteur Marc Dodeller et à David Dasilva. Merci pour le temps que vous avez consacré à l'analyse de nos produits.*

***Mademoiselle le Docteur Sophie Pinel**, je te remercie chaleureusement pour m'avoir fait partager tes connaissances avec sympathie et pédagogie. **Mademoiselle le docteur Marianne Labussière**, merci pour ton aide précieuse et ton soutien.*

Un grand merci également à toute l'équipe « adressage de molécules photoactivable » pour les agréables moments d'échanges scientifiques et pour votre sympathie.

Merci à toute l'équipe, du CAV pour votre accueil chaleureux, vous avez tous participé à mon enrichissement scientifique et personnel.
Un merci particulier à Aurélie, Carole, les Maries et Dominique pour avoir été toujours disponible et pour m'avoir aidé dans divers domaines.

***Le comité de Meuse de la Ligue Nationale Contre le Cancer**, Je vous remercie sincèrement de m'avoir attribué successivement trois bourses de recherche. Ce soutien financier m'a permis de mener sereinement mon travail de thèse.*

Une dédicace à mes amis qui se reconnaîtront aux quatre coins de la France et parfois même plus loin. Grâce à vous j'ai pu m'évader et les moments de détentes que j'ai pu partager avec et grâce à vous ont été des bouffées d'oxygène.

J'embrasse tendrement Jordane pour m'avoir soutenue et supportée durant ce parcours commun et simplement pour l'amour qu'il me porte. Je tiens également à remercier sa famille, Jacky, Nicole et Cédric pour votre chaleureux accueil et votre gentillesse.

Un grand merci à toute ma famille et plus particulièrement à mes parents, merci pour m'avoir toujours soutenue dans mes choix, merci pour votre confiance. Merci à mes petites sœur Emeline et Mélanie, merci de m'avoir soutenue et surtout de m'avoir supporté (pas que durant ma thèse d'ailleurs). Merci à ma grand mère Simone pour son amour et un clin d'œil aux mini miss (Zoé et Ana) que j'ai vu grandir avec plaisir durant cette thèse.

A Emile, Huguette et René mes regréttés grands-parents,

Production scientifique

Publications

Thomas N., Bechet D., Tirand L., Becuwe P., Vanderesse R., Frochot C., Guillemin F., Barberi-Heyob M. *Peptide-conjugated chlorine-type photosensitizer binds neuropilin-1* in vitro *and* in vivo. **J Photochem Photobiol B,** 2009. Sous presse. IF 2007 = 1,92

Tirand L., Bastogne T., Bechet D., Linder M., **Thomas N**., Frochot C., Guillemin F., Barberi-Heyob M. *Response Surface Methodology: an extensive Potential to Optimize* in vivo *Photodynamic Therapy Conditions*. **Int J Rad Oncol Biol Phys**, 2009. Sous presse. IF 2007 = 4,29

Thomas N., Tirand L., Chatelut E., Plenat F., Frochot C., Dodeller M., Guillemin F., Barberi-Heyob M. *Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice*. **Photochem Photobiol Sci**, 2008, 7(4):433-41. IF 2007 = 2,21

Tirand L., **Thomas N**., Dodeller M., Dumas D., Frochot C., Maunit B., Guillemin F., Barberi-Heyob M. *Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 : an* in vivo *and* in vitro *study*. **Drug Metab Dispos**, 2007, 35(5):806-13. IF 2007 = 3,91

Schneider R., Tirand L., Frochot C., Vanderesse R., **Thomas N**., Gravier J., Guillemin F., Barberi-Heyob M. *Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy*. **Anticancer Agents Med Chem**, 2006, 6(5):469-88. IF. Publication sur invitation.

Tirand L., Frochot C., Vanderesse R., **Thomas N.**, Trinquet E., Pinel S., Viriot M.L., Guillemin F., Barberi-Heyob M. *A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells*. **J Control Release**, 2006, 111(1-2):153-64. IF 2007 = 4,76

Communications orales et par affiche

Thomas N., Tirand L., Chatelut E., Plénat F., Frochot C., Dodeller M., Guillemin F., Barberi-Heyob M. *Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice.* 5-8 Juil 2008. **20th Meeting European Association for Cancer Research**. Lyon (France). Elsevier, Eur J Cancer. Suppl. p 25. Communication par affiche

Thomas N. *Ciblage de la neuropiline-1 pour potentialiser l'effet anti-vasculaire de la PDT.* 29 mai 2008. **GDR 3049 PHOTOMED. Médicaments photoactivables – photochimiothérapie.** Vandœuvre-lès-Nancy. Communication orale

Thomas N., Tirand L., Bechet D., Vanderesse R., Frochot C., Guillemin F., Barberi-Heyob M**.** *Profil métabolique et stabilité d'un peptide ciblant la neuropiline-1 conjugué à un photosensibilisateur : étude* in vitro *et* in vivo. Nov 2007. **Journée Claude Huriet de la Recherche Médicale**. Vandœuvre-lès-Nancy. Communication orale

Thomas N., Tirand L., Bechet D., Vanderesse R., Plénat F., Frochot C., Guillemin F., Barberi-Heyob M. *Metabolic profile and* in vivo *stability of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitiser targeting neuropilin-1: Interest of pseudopeptides.* 1-6 Sept 2007. **12th Congress of ESP**. Bath (Grande Bretagne). Communication par affiche

Thomas N., Tirand L., Vanderesse R., Frochot C., Guillemin F., Barberi-Heyob M. *Etude de l'affinité de pseudopeptides vis-à-vis des récepteurs au VEGF : Vers l'élaboration de médicaments photo-activables conjugués plus stables pour des applications en thérapie photodynamique anticancéreuse.* 20-25 Mai 2007. **15°Congrès Peptides et Protéines**. Dinard (France). Communication par affiche

Thomas N., Tirand L., Chatelut E., Dodeller M., Frochot C., Guillemin F., Barberi-Heyob M. *A chlorin-ATWLPPR conjugate as new neuropilin-1-targeting photosensitizer designed to potentiate the vascular effect of PDT : pharmacokinetic and biodistribution analysis.* 10-14 Oct 2006. **6th International Symposium on Photodynamic Diagnosis and Therapy in Clinical Practice.** Brixen (Italie). Communication par affiche

Table des matières

Liste des tableaux **1**

Liste des figures **2**

Liste des abréviations **4**

Introduction **7**

Chapitre I : Synthèse bibliographique **11**

I. Thérapie photodynamique 11
I.1 Rappel historique et principe 11
I.2 Réactions photochimiques 12
I.3 Le photosensibilisateur idéal 16
I.4 Mécanismes de l'éradication tumorale après thérapie photodynamique 20
II. L'angiogenèse tumorale 24
II.1 Définition et mécanismes de l'angiogenèse tumorale 24
II.2 Facteurs pro- et anti-angiogéniques 27
II.3 Caractéristiques des vaisseaux tumoraux 31
III. Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF) 33
III.1 Le VEGF et la famille du VEGF 33
III.2 Les récepteurs au VEGF 38
IV. Ciblage des photosensibilisateurs 47
IV.1 Ciblage passif 47
IV.2 Ciblage actif 54
IV.3 Intérêt des ligands peptidiques dans les stratégies de ciblage en thérapie photodynamique 66
V. Stratégies pour améliorer la stabilité peptidique 87
V.1 Introduction 87
V.2 Peptides modifiés 88
V.3 Pseudopeptides 93
V.4 Peptidomimétiques 97

Chapitre II : Etude comparative de la TPC *versus* TPC-Ahx-ATWLPPR *in vitro* et *in vivo* **99**

I. Résumé 99
II. "Peptide-conjugated chlorine-type photosensitizer binds neuropilin-1 *in vitro* and *in vivo*"99

Chapitre III : Stabilité *in vitro* et *in vivo* de la TPC-Ahx-ATWLPPR **121**

I. Résumé 121
II. "Metabolic Profile of a Peptide-Conjugated Chlorin-Type Photosensitizer Targeting Neuropilin-1: An *in Vivo* and *in Vitro* Study" 122

Chapitre IV : Pharmacocinétique et biodistribution du peptide conjugué et de son produit de dégradation 131

I. Résumé..... 131
II. "Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice" 132

Chapitre V : Elaboration de peptides modifiés 143

I. Matériel et Méthodes 143
I.1 Synthèse peptidique sur phase solide 143
I.2 Purification des peptides par chromatographie préparative 149
I.3 Caractérisations chimiques..... 149
I.4 Caractéristiques photophysiques 150
I.5 Evaluation de l'affinité moléculaire des peptides par tests de *binding* en ELISA par compétition..... 152
I.6 Création d'une lignée cellulaire NRP-1 négative par ARN interférence 153
I.7 Cinétiques d'incorporation des photosensibilisateurs dans la lignée NRP-1 négative 164
I.8 Biodistribution et stabilité des PSs chez la souris 165
II. Résultats et Discussion 167
II.1 Structure des peptides, pseudopeptide et chlorine conjuguées 167
II.2 Caractérisations chimiques des peptides et pseudopeptide seuls et conjugués à la TPC après purification 168
II.3 Caractéristiques photophysiques des PSs..... 172
II.4 Affinité des peptides vis-à-vis des récepteurs et co-récepteurs au $VEGF_{165}$ par test de *binding* 174
II.5 Comparaison de l'incorporation cellulaire des conjugués 177
II.6 Stabilité *in vivo* des peptides conjugués..... 180
III. Conclusion 182

Chapitre VI : Synthèse générale et perspectives 183

Références bibliographiques 187

Annexes 205

I. "A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells."…… 205
II. "Response surface methodology : an extensive potential to optimize *in vivo* photodynamic therapy conditions"..... 219

Liste des tableaux

Chapitre I

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux PSs ayant une AMM..... 18
Tableau 2 : Distribution *in vitro* et *in vivo* des photosensibilisateurs liés aux protéines et lipoprotéines sériques. 19
Tableau 3 : Principaux facteurs pro-angiogéniques 28
Tableau 4 : Les principaux facteurs anti-angiogéniques 31
Tableau 5 : Affinité des membres de la famille du VEGF pour les récepteurs de cette famille (valeur des constantes de dissociation K_d en $mol.L^{-1}$). 38
Tableau 6: La famille du VEGF et leurs récepteurs..... 39
Tableau 7 : Schéma de la stucture et des fonctions des neuropilines. 43
Tableau 8 : Principaux marqueurs des néo-vaisseaux tumoraux..... 64

Chapitre V

Tableau 9 : Concentration en récepteurs et ligands utilisés pour le test ELISA..... 153
Tableau 10 : Description des sites des oligonucléotides de la Figure 35. 155
Tableau 11 : Description des amorces spécifiques utilisées pour la PCR..... 159
Tableau 12 : Composition du mélange pour l'amplification du gène codant NRP-1..... 159
Tableau 13 : Cycles d'amplification du gène codant NRP-1 159
Tableau 14 : Composition du tampon de lyse..... 160
Tableau 15 : Composition des gels d'acrylamide..... 161
Tableau 16 : Composition du tampon de transfert 162
Tableau 17 : Protocole d'activation des membranes 162
Tableau 18 : Déplacements chimiques des protons de ATWLPPR dans le DMSO deutéré (ppm) 169
Tableau 19 : Déplacements chimiques des protons de aTWLPPR dans le DMSO deutéré (ppm) 169
Tableau 20 : Déplacements chimiques des protons de AΨ[CH_2NH]TWLPPR dans le DMSO deutéré (ppm) .. 169
Tableau 21 : Déplacements chimiques des protons de rpplwta (rétro-inverso) dans le DMSO deutéré (ppm)... 169
Tableau 22 : Déplacements chimiques des protons de TPC-Ahx-ATWLPPR dans le DMSO deutéré (ppm).... 170
Tableau 23 : Déplacements chimiques des protons de TPC-Ahx-aTWLPPR dans le DMSO deutéré(ppm)..... 170
Tableau 24 : Déplacements chimiques des protons de TPC-Ahx-AΨ[CH_2NH]TWLPPR dans le DMSO deutéré (ppm) 170
Tableau 25 : Temps de rétention moyen (min) des PSs conjugués..... 171
Tableau 26 : Comparaison des masses des PSs calculées et obtenues..... 171
Tableau 27 : Propriétés photophysiques des PSs dans l'éthanol. 173
Tableau 28 : Concentrations en ligand compétiteur permettant de déplacer 50% du VEGF biotinylé (EC_{50}) pour les différents peptides conjugués ou non à la chlorine, sur les co-récepteurs NRP-1 et NRP-2..... 176

Liste des figures

Chapitre I

Figure 1 : Diagramme simplifié schématique de Perrin-Jablonski 13
Figure 2 : Pénétration de la lumière dans les tissus. 16
Figure 3 : Structures chimiques des principaux PSs. 17
Figure 4 : Mécanismes de destruction tumorale après PDT 20
Figure 5 : Etapes de l'angiogenèse tumorale 27
Figure 6 : Implication des facteurs angiogéniques dans la maturation des capillaires. 29
Figure 7 : Représentation schématique des effets de la thrombospondine sur les cellules endothéliales 30
Figure 8 : Comparaison de l'aspect de vaisseaux sanguins normaux (*vasa vasorum* de sinus carotidien de rat, *gauche*) et tumoraux (xénogreffe de tumeur humaine chez la souris *nude*, *droite*), par microscopie électronique à balayage. 32
Figure 9 : Fonctions multiples du VEGF 34
Figure 10 : Régulation de l'activité de HIF-1. 35
Figure 11 : Structure des récepteurs du VEGF à activité tyrosine kinase. 40
Figure 12 : Interactions de la NRP-1 avec VEGFR-2/KDR 46
Figure 13 : Stratégies générales de ciblage des photosensibilisateurs vis-à-vis des cellules néoplasiques. 47
Figure 14 : Comportement *in vivo* de différents types de systèmes vecteurs des PSs 48
Figure 15 : Devenir d'un système PS possédant différents modules 54
Figure 16 : Signalisation des LDL 58
Figure 17 : Principe du PMB (*photodynamic molecular beacon*) 62
Figure 18 : Schéma d'un capillaire sanguin. 63
Figure 19 : Structure générale des acides aminés 87
Figure 20 : Formation de la liaison entre deux acides aminés 88
Figure 21 : (a) Acétylation en *N*-terminal, (b) Amidation en *C*-terminal. 89
Figure 22 : peptide LPFFD modifié en *N*- et *C*-terminales 90
Figure 23 : Exemple de peptide cyclique *hétérodétique*. 90
Figure 24 : (a) peptide naturel, (b) peptide *N*-méthylé 91
Figure 25 : *L*-peptide, *D*-peptide et rétro inverso peptide. 93
Figure 26 : Structure chimique de AlaAlaAla (a) et Alaψ[CH_2NH]AlaAla (b) 94
Figure 27 : (a) Modèles de peptide naturel, (b) modèle de peptoïde. 96
Figure 28 : Structure chimique du Reyataz® (Atazanavir, BMS-232632) 97

Chapitre V

Figure 29 : Schéma des étapes de la synthèse peptidique en phase solide 144
Figure 30 : Synthèse du Fmoc-leucinal (3) 147
Figure 31 : Structure de l'amide de Weinreb caractérisée par RMN du proton (300MHz, $CDCl_3$) 147
Figure 32 : Structure de Fmoc-Ala-H caractérisé par RMN du proton (300MHz, $CDCl_3$) 148
Figure 33 : Représentation schématique simplifiée de la technique d'ARN interférence 154
Figure 34 : Carte du plasmide pSIREN linéaire 154
Figure 35 : Séquences des oligonucléotides permettant la synthèse de siARN correspondant à l'ARNm de NRP-1 155
Figure 36 : Schéma du système de transfert semi-sec des protéines du gel sur la membrane 163
Figure 37 : Structure chimique des peptides et pseudopeptide ATWLPPR, aTWLPPR, Aψ[CH_2NH]TWLPPR et rpplwta 167
Figure 38 : Structure chimique des chlorines conjuguées TPC-Ahx-ATWLPPR et TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR 168
Figure 39 : Spectre de masse des PSs après purification HPLC 172
Figure 40 : Spectre d'absorption des PSs dans l'éthanol. TPC-Ahx-ATWLPPR (en noir), TPC-Ahx-aTWLPPR (en rouge) et TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR (en vert). 173
Figure 41 : Affinité des différents peptides vis-à-vis des récepteurs au VEGF : NRP-1, NRP-2 et Flt-1 174
Figure 42 : Déplacement du VEGF biotinylé sur NRP-1 et NRP-2 en fonction de la concentration en peptide : ATWLPPR (noir), aTWLPPR (rouge) et Aψ[CH_2NH]TWLPPR (vert). 175
Figure 43 : Déplacement du VEGF biotinylé sur NRP-1 et NRP-2 en fonction de la concentration en chlorine conjuguée : TPC-Ahx-ATWLPPR (noir), -aTWLPPR (rouge) et –Aψ[CH_2NH]TWLPPR (vert) 176

Figure 44 : A. Analyse de l'expression protéique de NRP-1 par Western Blot pour les cellules MDA-MB-213 sauvages (WT) et celles transfectées par le plasmide pSIREN (NRP-1 siARN). B. Rapport d'expression relative (RER). n=2, * p< 0,05 177
Figure 45 : A. Analyse de l'expression des transcrits par RT-PCR des MDA-MB-213 sauvages (WT) et transfectées par le plasmide pSIREN (NRP-1 siARN). B. Rapport d'expression relative (RER), n=3, * p< 0,05 178
Figure 46 : Pourcentage d'incorporation des PSs conjugués par rapport à celui de la chlorine après 24 h d'incubation pour la lignée MDA-MB-231 sauvage 178
Figure 47 : Incorporation cellulaire après 2, 6 et 24 h de contact, des PSs conjugués pour la lignée sauvage MDA-MB-231 sur-exprimant NRP-1 (WT) ou la lignée *knockdown* exprimant faiblement NRP-1 (NRP-1 siARN) 179
Figure 48 : Spectre de masse des PSs dans le plasma 1 h (à gauche) et 4 h (à droite) après injection par voie intraveineuse (5,6 mg/kg) chez la souris *nude*. 180
Figure 49 : Concentration plasmatique en fonction du temps après injection de 2,8 mg/kg chez la souris *nude* en TPC-Ahx-ATWLPPR (blanc), -aTWLPPR (gris) et –Aψ[CH_2NH]TWLPPR (noir) en pourcentage de la dose injectée par mL de plasma. Moyenne ± écart-type pour 3 à 6 expérimentations. 181
Figure 50 : Concentration tumorale en fonction du temps en TPC-Ahx-ATWLPPR (blanc) et son produit de dégradation TPC-Ahx-A (hachuré) comparé à la TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR (noir) en pourcentage de la dose injectée par g de tumeur après injection de 2,8 mg/kg chez la souris *nude* xénogreffée (U87). n=3 à 6. 182

Liste des abréviations

ACE	**A**ntigène **c**arcino-**e**mbryonnaire
ADN	**A**cide **d**ésoxyribo**n**ucléique
ADNc	ADN **c**omplémentaire
Ahx	Acide **a**mino**hex**anoïque
Ala (A)	Alanine
ALA	**A**cide 5-**a**mino**l**évulinique
AlCIPc	**P**hthalo**c**yanine d'aluminium chlorée
AMM	**A**utorisation de **m**ise sur le **m**arché
Ang	**Ang**iopoïétine
Arg (R)	Arginine
ARNm	ARN (acide ribonucléique) **m**essager
ARNT	***A**ryl hydrocarbon **n**uclear **t**ranslocator*
Asp (D)	Asparagine
ATNBS	**A**cide **t**ri**n**itro**b**enzène **s**ulfonique
BCA	**B**actério**c**hlorine **a**
BChl-a	**B**actério**chl**orophylle-**a**
BET	**B**romure d'**ét**hidium
Boc	*tertio*-**b**utyl**o**xy**c**arbonyle
BPD-MA	***B**enzo**p**orphyrin **d**erivative **m**onoacid ring **A***
BSA	**A**lbumine **b**ovine **s**érique
Bzl	Benzyl
CAMAL	***L**eukemia-associated antigen*
$CDCl_3$	Trichlorométhane deutéré
CE	**C**ellule **e**ndothéliale
CHAPS	*3-[(3-**Ch**olamidopropyl)dimethyl**a**mmonio]-1-**p**ropane**s**ulfonate*
CI	**C**onversion **i**nterne
CIS	**C**onversion **i**nter**s**ystème
CMA	**C**hlorine e6 **m**onoéthylène diamine mono**a**cide
CML	**C**ellule **m**usculaire **l**isse
CMR	Crémophor®
Cys (C)	Cystéine
DCI	**D**énomination **c**ommune **i**nternationale
DHB	acide **di**h**y**droxy**b**enzoïque
DIEA	**Di**isopropyl-**é**thyl-**a**mine
DMF	**Dim**éthyl**f**ormamide
DMLA	**D**égénérescence **m**aculaire **l**iée à l'**â**ge
DMPC	**Dim**yristoyl **p**hosphatidyl**c**holine
DMSO	**Dim**éthyl **s**ulf**o**xide
DO	**D**ensité **o**ptique
DPPC	**Di**plamitoyl**p**hosphatidyl-**c**holine
dTMP	**d**ésoxy**t**hymidine **m**onophosphate
dUMP	**d**ésoxy**u**ridine **m**ono**p**hosphate
EC_{50}	Concentration conduisant à 50% d'inhibition ou d'antagonisme
ED-B	**E**xtra **d**omaine **B**
EDTA	**A**cide **é**thylène**di**amine **t**étraacétique
EGF	***E**pidermal **g**rowth **f**actor*
EGFR	**R**écepteur à l'EGF
ELISA	***E**nzyme **l**inked **i**mmunosorbent **a**ssay*
EPO	**E**rythro**po**ïétine
EPR	***E**nhanced **p**ermeability and **r**etention*
ERO	**E**spèces **r**éactives de l'**o**xygène
FDA	***F**ood and **d**rug **a**dministration*
FGF	***F**ibroblast **g**rowth **f**actors*
Flk-1	***F**etal **l**iver **k**inase-1*
Flt	*fms-like tyrosine kinase*
Fmoc	N-(9-**f**luorényl-**m**éth**o**xy**c**arbonyle)
FR	***F**olate **r**eceptor*
FRET	***F**örster **r**esonance **e**nergy **t**ransfer*
GAPDH	**G**lycér**a**ldéhyde-3-**p**hosphate **dés**hydrogénase
G-CSF	***G**ranulocyte **c**olony-**s**timulating **f**actor*
GIPC	RGS-**G**AIP ***i**nteracting **p**rotein **C** terminus*
Glu (Q)	Glutamine
GLUTs	Transporteurs de **glu**cose
Gly (G)	Glycine

GM-CSF	***G**ranulocyte-**m**acrophage **c**olony-**s**timulating **f**actor*
HDL	***H**igh **d**ensity **l**ipoprotein*
HGF/SF	***H**epatocyte **g**rowth **f**actor/ **s**catter **f**actor*
HIF	**H**ypoxia-**i**nducible **f**actor
HOBt	**H**ydr**o**xy**b**enzo**t**riazole
Hp	**H**émato**p**orphyrine
HpD	**H**émato**p**orphyrine **d**érivée
HPLC	***H**igh **p**erformance **l**iquid **c**hromatography*
HPPH	2-devinyl-2-(1-**h**exyloxyéthyl) **p**yro**ph**éophorbide
HRE	***H**ypoxia **r**esponse **e**lement*
HUVEC	***H**uman **u**mbilical **v**ein **e**ndothelial **c**ell*
Hy	**Hy**péricine
i.v.	**i**ntra-**v**eineuse
IBCF	***I**so**b**utyl**c**hloro**f**ormiate*
ICAM	***I**nter**c**ellular **a**dhesion **m**olecule*
ICPP	***I**ncreasing **c**apillary **p**ermeability **p**rotein*
IDL	**I**ntervalle **d**rogue-**l**umière
Ig	**I**mmuno**g**lobuline
IGF	***I**nsulin-like **g**rowth **f**actor*
IL	**I**nter**l**eukine
IR	**I**nfra-**r**ouge
KDR	***K**inase insert **d**omain-containing **r**eceptor*
$KHCO_3$	Hydrogénocarbonate de potassium
$KHSO_4$	Hydrogénosulfate de potassium
LB	**L**uria **B**ertani
LD_{50}	**D**ose **l**étale **50**
LDL	***L**ow **d**ensity **l**ipoprotein*
Leu (L)	Leucine
$LiAlH_4$	Tétrahydrure d'aluminium et de lithium
Lys (K)	Lysine
MALDI TOF	***M**atrix-**a**ssisted **l**aser **d**esorption **i**onization-**t**ime **o**f **f**light*
MB	***M**olecular **b**eacon*
MEC	**M**atrice **e**xtra**c**ellulaire
Met (M)	Méthionine
$MgSO_4$	Sulfate de magnésium
MIP	***M**acrophage **i**nflammatory **p**rotein*
MMP	***M**atrix **m**etallo **p**roteinase*
m-THPC	**M**éso-**t**étra**h**ydroxy**p**hényl **c**hlorine
m-THPP	**M**éso-**t**étra**h**ydroxy**p**hényl **p**orphyrine
m-TPP $(Glu)_3$	5,10,15-***m**éso* **t**ri-(*méta-O*-β-D-**glu**cosyloxyphényl)-20-**p**hényl**p**orphyrine
m-TPP	***m**éso*-**t**étra**p**hényl**p**orphyrine
m-TPPPL	***m**éso*-**t**étra**p**hényl**p**or**p**ho**l**actol
MTT	Bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium
$NaBH_3CN$	Cyanoborohydride de sodium
NIP	***N**RP-1-**I**nteracting **P**rotein*
NLS	***N**uclear **l**ocalisation **s**ignal*
NMM	**N**-**m**éthyl**m**orpholine
NO	**O**xyde **n**itrique
NRP	Neuropiline
ORMOSIL	***Or**ganically **mo**dified **sil**ica*
PAI	***P**lasminogen **a**ctivator **i**nhibitor*
PBS	***P**hosphate **b**uffered **s**aline*
PC	***P**roprotein **c**onvertases*
Pc4	Silicon phtalocyanine
PCR	***P**olymerase **c**hain **r**eaction*
PCR	***P**olymerase **c**hain **r**eaction*
PD-ECGF/TP	***P**latelet-**d**erived **e**ndothelial **c**ell **g**rowth **f**actor/**t**hymidine **p**hosphorylase*
PDGF	***P**latelet **d**erived **g**rowth **f**actor*
PDT	**T**hérapie **p**hoto**d**ynamique
PDZ	**P**SD-95/**D**lg/**Z**O-1
Phe (F)	Phénylalanine
PI3K	***P**hosphatidyl**i**nositol **3**-**k**inase*
PLA	**P**oly(*DL*-**la**ctide)
PLGA	poly(*DL*-lactide-co-glycolide)
PlGF	***Pl**acental **g**rowth **f**actor*
PMB	***P**hotodynamic **m**olecular **b**eacon*
Pmc	***P**enta**m**ethyl**c**hroman sulfonyl*

PMSF	***P**henyl**m**ethyl**s**ulphonyl**f**luoride*
pO_2	Pression partielle en oxygène
ppi	**p**our **p**reparation **i**njectable
PpIX	**P**roto**p**orphyrine **IX**
Pro (P)	Proline
PS	**P**hoto**s**ensibilisateur
PSMA	***P**rostate-**s**pecific **m**embrane **a**ntigen*
PTEN	***P**hosphatase and **TEN**sin homolog deleted on chromosome TEN*
p-THPP	méso-**t**étra (***p***-**h**ydoxy-**p**hényl) **p**orphyrine
PVA	**P**olyvinyl **a**lcool
PVDF	***P**oly**V**inyli**D**ene **F**luoride*
pVHL	**P**rotéine **v**on **H**ippel-**L**indau
Pyro-2DG	**Pyro**phéophorbide **2**-**d**éoxy**g**lucose
RER	**R**apport d'**e**xpression **r**elative
RISC	***R**NA **i**nduced **s**ilencing **c**omplex*
RMN	**R**ésonance **m**agnétique **n**ucléaire
RT	***R**everse **t**ranscriptase*
RTK	**R**écepteur à activité **t**yrosine kinase
SDS	***S**odium **d**odecyl**s**ulfate*
SEMA	**Séma**phorine
SEMCAP-1	M-SemaF *cytoplasmic domain associated protein-1*
SiPc	bis(méthyl-oxyéthylèneoxy)**si**licon-**p**htalo**c**yanine
siRNA	***S**mall **i**nterference **r**ibo**n**ucleic **a**cid*
$SnET_2$	Tin étiopurpurine
sNRP	**N**eu**r**o**p**ilines **s**olubles
SPPS	Synthèse **p**eptidique en **p**hase **s**olide
SVF	**S**érum de **v**eau **f**oetal
TBE	**T**RIS **b**orate **E**DTA
TBST	***T**ris **b**uffered **s**aline **t**wenn 20*
TBTU	**T**rifluoroborate de 2-(1H-**b**enzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-**t**étraméthyl**u**ronium)
tBu	Tertiobutyl
TEM	***T**umor **e**ndothelial **m**arkers*
TEMED	N,N,N',N'-t**é**tra**m**éthyl**é**thylène**d**iamine
TFA	Acide **tri**fluoro**a**cétique
TGF	***T**ransforming **g**rowth **f**actor*
TGS	**T**ris **g**lycine **S**DS
THF	**T**étra**h**ydro**f**urane
Thr (T)	Thréonine
Tie2/Tek	***T**unica **i**nternal **e**ndothelial cell **k**inase*
TIMP	***T**issue **i**nhibitor of **m**etallo**p**roteinases*
TK	**T**yrosine **k**inase
TNFα	***T**umor **n**ecrosis **f**actor* α
tPA	**A**ctivateur du **p**lasminogène de type **t**issulaire
TPC	**T**étra**p**hényl chlorine
TPP	**T**étra**p**hényl **p**orphyrine
Trp (W)	Tryptophane
TSP/TSP-1	**T**hrombo**sp**ondine-1
Tyr (Y)	Tyrosine
uPA	**A**ctivateur du **p**lasminogène de type **u**rokinase
Val (V)	Valine
VCAM	***V**ascular **c**ell **a**dhesion **m**olecule*
VEGF	***V**ascular **e**ndothelial **g**rowth **f**actor*
VPF	***V**ascular **p**ermeability **f**actor*
Zn Pc	**P**htalo**c**yanine de **Zn** II
α-SMA	***α**-**s**mooth **m**uscle **a**ctin*

Introduction

Introduction

La thérapie photodynamique (PDT) est préconisée dans le traitement de certaines maladies dermatologiques, ophtalmologiques et en oncologie. Son principe est basé sur l'association de l'oxygène, de la lumière et d'un photosensibilisateur ou agent photosensibilisateur (PS) non toxique à l'obscurité. Les PSs actuellement disponibles en clinique sont dotés d'une relativement faible sélectivité pour le tissu à traiter. En PDT anti-cancéreuse, la destruction tumorale résulte, soit directement de réactions de photo-oxydation induites au sein de la cellule néoplasique, soit indirectement de réactions inflammatoires locales accompagnées d'une altération de la vascularisation caractérisée par des variations du flux sanguin et des stases micro-vasculaires générant une hypoxie tumorale. Les dommages vasculaires induits sont considérés comme étant un phénomène majeur, contribuant largement à l'efficacité du traitement. Cet effet anti-vasculaire de la PDT peut être potentialisé en élaborant des PSs adressés se localisant préférentiellement au niveau du compartiment vasculaire tumoral. Ce nouveau mode de traitement photodynamique est appelé V*ascular Targeted Photodynamic therapy* (VTP).

Dans l'objectif de favoriser l'effet anti-vasculaire de la PDT, la stratégie que nous développons vise à améliorer le tropisme tumoral d'un PS en le couplant à un heptapeptide reconnu par un récepteur impliqué dans la néo-vascularisation tumorale et sur-exprimé majoritairement par les cellules endothéliales angiogéniques. Le ciblage choisi implique le récepteur de type 2 au VEGF (*vascular endothelial growth factor*, Flk-1/KDR) et son co-récepteur la neuropiline-*1* (NRP-1) (Soker *et al.*, 2002).

Notre approche a consisté à coupler la tétraphénylchlorine (TPC), *via* un bras espaceur (acide amino hexanoïque, Ahx) à un heptapeptide (ATWLPPR) isolé par phage display (Binetruy-Tournaire *et al.*, 2000). Préalablement, la spécificité de fixation du PS conjugué vis-à-vis de la protéine chimérique recombinante NRP-1 a été étudiée, démontrant la spécificité du peptide ATWLPPR et du conjugué TPC-Ahx-ATWLPPR pour le co-récepteur NRP-1 et non pour KDR. La photocytotoxicité du conjugué sur des cellules endothéliales a été améliorée d'un facteur sept par rapport à la TPC due à l'amélioration d'incorporation. L'étude *in vivo* de la TPC-Ahx-ATWLPPR a été initiée sur un modèle de gliome malin (lignée U87), xénogreffé en ectopique chez la souris *nude*. Au laboratoire, nous avions, sur ce modèle, préalablement mis en évidence une angiogenèse tumorale conséquente, par le suivi

de la densité vasculaire, du taux de VEGF diffusible et de la pression partielle en oxygène (Pinel *et al*., 2004). Le rationnel à ce travail de thèse a été publié et est présenté en annexe (Tirand *et al.*, J Control Release, 2006).

Ce manuscrit comprend, dans un **premier chapitre**, la **synthèse bibliographique,** divisée en cinq sous-chapitres, dans lesquels seront successivement décrits, le principe de la PDT, les caractéristiques morphologiques du processus angiogénique, puis le rôle essentiel du VEGF et ses récepteurs dans les mécanismes moléculaires de l'angiogenèse. La quatrième partie, consacrée aux stratégies de ciblage en PDT est complétée par une revue que nous avons publiée, détaillant les avantages liés à l'utilisation de peptides (Schneider *et al.*, Anticancer Agents Med Chem, 2006). Ce chapitre s'achève par la description des différentes approches permettant d'améliorer la stabilité peptidique.

Dans un **deuxième chapitre,** nous comparons la sélectivité de la TPC *versus* le PS conjugué TPC-Ahx-ATWLPPR *in vitro* et *in vivo*. Nous avons élaboré, sélectionné et caractérisé une lignée, dont l'expression du gène codant NRP-1 est éteinte par la technique d'ARN-interférence, à partir de la lignée MDA-MB-231 sauvage surexprimant ce co-récepteur. L'incorporation des deux PSs a été comparée sur ces deux lignées. La localisation intra tumorale *in vivo* chez la souris *nude* xénogreffée en ectopique par un gliome malin humain (U87) a été évaluée par une technique d'immunohistochimie. Ce travail est soumis à publication. L'article précédé par un résumé en français est inclus dans ce chapitre. L'efficacité photodynamique *in vivo* a également été présentée dans ce travail. Pour ce faire, les conditions de traitement avaient été préalablement optimisées en utilisant une méthodologie de plan d'expériences. Cette publication est également insérée dans l'annexe du manuscrit.

La conjugaison de PSs à de petits peptides afin d'améliorer leur sélectivité vis-à-vis du tissu cancéreux présente de nombreux avantages, notamment leur petite taille, leur facilité de synthèse et leur affinité pour leur récepteur (Schneider et *al.*, Anticancer Agents Med Chem, 2006). Cependant, leur limite réside dans un manque de stabilité potentiel, du fait de la présence d'exo- et d'endo-peptidases *in vitro* et *in vivo* susceptibles de les dégrader. Dans **un troisième chapitre**, nous présenterons les résultats publiés (Tirand, Thomas *et al.*, Drug Metab Dispos, 2007) de l'étude de stabilité de la TPC-Ahx-ATWLPPR *in vitro* et *in vivo.*

Dans **un quatrième chapitre**, la pharmacocinétique et la biodistribution de la TPC-Ahx-ATWLPPR et de son produit de dégradation ont été étudiées après injection par voie intra-veineuse pour notre modèle de souris xénogreffées (Thomas *et al*., Photochem Photobiol Sci, 2008).

Ces deux dernières études publiées nous ont permis de préciser les sites de coupure par les peptidases et ainsi, d'élaborer de nouveaux peptides susceptibles d'être plus stables *in vivo*. L'élaboration de ces nouveaux peptides est décrite dans **un avant dernier chapitre**. Deux peptides ont été retenus et couplés à la TPC afin d'évaluer leur incorporation sur le modèle cellulaire MDA-MB-231 traité par ARN interférence précédemment décrit, et de vérifier leur sélectivité *in vitro* et leur stabilité *in vivo*. Les synthèses, purifications, caractéristiques photophysiques et chimiques ainsi que les affinités vis-à-vis des récepteurs au VEGF sont détaillées.

Une **synthèse générale** des résultats et les **perspectives** à court et moyen terme terminent ce mémoire.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I. Thérapie photodynamique

I.1 Rappel historique et principe

Les effets thérapeutiques de la lumière sont connus depuis l'Antiquité. Les Egyptiens utilisaient déjà la lumière combinée à des substances naturelles pour traiter des maladies de peau. Ce n'est qu'à la fin du XIXème siècle que le concept de photosensibilisation apparaît lorsque Oscar Raab décrit pour la première fois le phénomène phototoxique en associant un colorant (l'acridine) à la lumière (Raab, 1900). 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 » (von Tappeiner, 1904). Cette supposition sera confirmée en 1909 par Hasselbach qui rédigera le premier rapport sur le caractère phototoxique de l'hématoporphyrine Hp, un dérivé de l'hème (Hausmann, 1911). 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 (Policard, 1924). 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 (Figge *et al.*, 1948). En 1955, une série d'expériences réalisées par Schwartz prouve que l'hématoporphyrine commerciale n'est pas un produit pur. Il constate que le produit pur qu'il a isolé est moins sélectif au niveau tumoral que le produit commercial (Schwartz *et al.*, 1955). En 1961, Lipson propose de purifier l'hématoporphyrine par action d'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. (Lipson et Baldes, 1960). Il est constitué d'un mélange complexe de porphyrines.

Ce n'est qu'au cours des années 1970, avec les expérimentations de Dougherty, que la thérapie photodynamique (PDT) connaît un véritable essor. Des traitements à base d'hématoporphyrine dérivée (HpD) et de lumière rouge ont montré de très bons résultats lors d'études précliniques et cliniques (Dougherty *et al.*, 1978). L'HpD a notamment donné

naissance à une fraction enrichie en composés actifs, le porfimer sodium ou Photofrin®, constitué d'un mélange de porphyrines présentes dans différents états (monomères, dimères et oligomères) ou des liaisons chimiques différentes (éthers et esters) (Brown *et al.*, 2004).

Actuellement, la thérapie photodynamique est préconisée dans le traitement de certaines maladies dermatologiques (Delesalle *et al.*, 2008), ophtalmologiques (Desmettre *et al.*, 2001) et en oncologie (Maunoury *et al.*, 2005). Son principe repose sur l'association de l'oxygène, de la lumière et d'un photosensibilisateur (PS) non toxique à l'obscurité et préférentiellement retenu par les tissus malades. La PDT anti-tumorale est un traitement local ou locorégional utilisé pour réduire le volume d'une tumeur massive, obtenir la cure radicale d'une petite tumeur superficielle, ou après échec d'une thérapie standard par chimiothérapie ou radiothérapie (Dougherty *et al.*, 1998).

En oncologie, le PS peut être administré par voie intra-veineuse ou topique. La lésion néoplasique est irradiée à une longueur d'onde spécifique. L'activité photodynamique du PS est basée sur des principes photophysiques, induisant dans un système biologique des réactions de photo-oxydation. Le délai entre l'administration du PS et l'irradiation des tissus (*drug-light interval* ou intervalle drogue-lumière, IDL) correspond en général, à la durée nécessaire pour un tropisme du PS en faveur de la tumeur par comparaison aux tissus sains (Dougherty *et al.*, 1998).

I.2 Réactions photochimiques

En absorbant un photon d'énergie hν, le PS passe de son état singulet fondamental ($^1PS_0$) à un état singulet excité ($^1PS_1$*, $^1PS_2$* ou $^1PS_3$…) correspondant à un état électronique d'énergie supérieure. Par une succession de relaxations vibrationnelles (conversions internes, CI), le PS revient à l'état excité de plus bas niveau d'énergie ($^1PS_1$*). Par conversion inter-système (CIS), le PS peut ensuite passer à un état triplet excité ($^3PS_1$*). Ces étapes sont représentées par l'Equation 1.

Equation 1 $$^1PS_0 \xrightarrow{h\nu} {}^1PS_n^* \xrightarrow{CI} {}^1PS_1^* \xrightarrow{CIS} {}^3PS_1^*$$

A ce stade, le retour à l'état fondamental correspond à une transition entre un état triplet excité ($^3PS_1$*) et l'état singulet fondamental ($^1PS_0$), transition dite interdite. Ainsi sa

durée de vie est plus longue (quelques µs) que l'état singulet (quelques ns), lui permettant de générer des espèces photo-actives à partir des deux voies principales de photo-oxydation de types I et II.

Pour le mécanisme de type I, le PS à l'état triplet réagit directement avec un substrat cellulaire pour former des espèces réactives de l'oxygène (ERO). Pour le mécanisme de type II, il s'agit d'un transfert d'énergie du PS dans son état triplet excité vers l'oxygène à l'état triplet fondamental ($^3O_2$).

D'après le diagramme de Perrin-Jablonski (Figure 1), deux processus entrent en compétition avec la formation de $^3PS_1$* : la désactivation non radiative et la fluorescence. Si le processus de désactivation non radiative doit idéalement être négligeable, il n'est pas inintéressant que le PS ait un rendement quantique de fluorescence relativement élevé. En effet, cette propriété d'émission de fluorescence des PS peut être mise à profit pour la détection et l'imagerie des tumeurs.

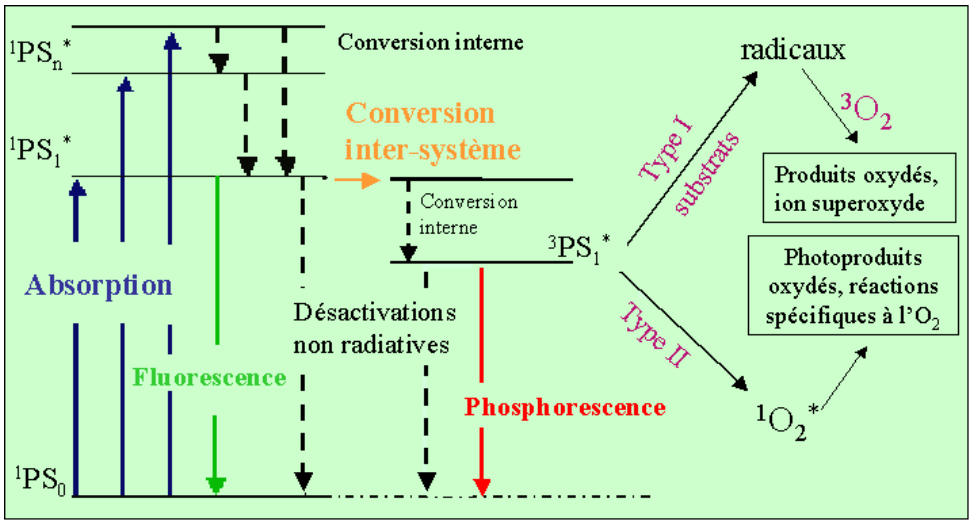


Figure 1 : Diagramme simplifié schématique de Perrin-Jablonski.

I.2.1. Type I

Le mécanisme dit de type I implique le transfert d'un électron (Equation 2 et Equation 3) ou d'un atome d'hydrogène (Equation 4 et Equation 5) entre le PS à l'état triplet ($^3PS_1$*) et des substrats biologiques (S) pour former des radicaux et des ions radicalaires conduisant à la formation d'espèces réactives de l'oxygène.

Equation 2 $^3PS_1^* + S \longrightarrow PS^{\bullet +} + S^{\bullet -}$

Equation 3 $^3PS_1^* + S \longrightarrow PS^{\bullet -} + S^{\bullet +}$

Equation 4 $^3PS_1\text{-}H^* + S \longrightarrow PS^{\bullet} + SH^{\bullet}$

Equation 5 $^3PS_1^* + SH \longrightarrow PS\text{-}H^{\bullet} + S^{\bullet}$

Les espèces radicalaires générées peuvent ensuite réagir rapidement avec l'oxygène moléculaire présent pour former des radicaux peroxydes, initiant ainsi une chaîne d'auto-oxydation (Equation 6 ou Equation 7).

Equation 6
$$\begin{cases} PS^{\bullet} + O_2 \longrightarrow PS\text{-}OO^{\bullet} \\ PS\text{-}OO^{\bullet} + PS\text{-}H \longrightarrow PS^{\bullet} + PS\text{-}OOH \end{cases}$$

Equation 7
$$\begin{cases} S^{\bullet} + O_2 \longrightarrow SOO^{\bullet} \\ SOO^{\bullet} + SH \longrightarrow S^{\bullet} + SOOH \end{cases}$$

Les anions radicaux du PS ou du substrat peuvent également interagir avec l'oxygène. Dans ce cas, le transfert d'électron qui a lieu entre les deux réactifs entraîne la formation de l'anion radical superoxyde $O_2^{\bullet -}$ (Equation 8).

Equation 8 $PS^{\bullet -}$ (ou $S^{\bullet -}$) + $O_2 \longrightarrow$ PS (ou S) + $O_2^{\bullet -}$

L'anion radical superoxyde ainsi formé peut réagir directement avec différents substrats ou agir comme précurseur d'autres ERO (Equation 9).

Equation 9
$$\begin{cases} O_2^{\bullet -} + H^+ \rightleftharpoons HO_2^{\bullet} \\ HO_2^{\bullet} + O_2^{\bullet -} + H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \\ H_2O_2 + O_2^{\bullet -} \xrightarrow[\text{Catalyseur}]{\text{Fer}} HO^{\bullet} + HO^- + O_2 \end{cases}$$

Les différentes ERO formées au cours des réactions photochimiques de type I (H_2O_2, $O_2^{\bullet -}$, $^{\bullet}OH$) représentent de puissants oxydants pour une grande variété de biomolécules telles que le cholestérol ou les chaînes latérales de certains acides aminés (tryptophane, histidine et méthionine) (Halliwell, 1999).

I.2.2. Type II

Le mécanisme dit de type II implique un transfert d'énergie du PS à l'état triplet ($^3PS_1$*) vers l'oxygène moléculaire qui, du fait de la présence de deux électrons célibataires dans sa couche externe, se trouve à l'état triplet à son état fondamental ($^3O_2$). L'oxygène moléculaire passe alors à un état singulet excité ($^1O_2^*$) et le PS retourne à son état fondamental (Equation 10).

Equation 10 $$^3PS_1^* + {}^3O_2 \longrightarrow {}^1PS_0 + {}^1O_2^*$$

Cette réaction n'est possible que si le PS possède une différence d'énergie entre $^3PS_1$* et $^1PS_0$ supérieure à la différence d'énergie entre $^1O_2^*$ et $^3O_2$, soit 94 kJ.mol^{-1} (Wilson et van Lier, 1989). L'oxygène singulet $^1O_2^*$ peut revenir à son état fondamental par émission de luminescence (1270 nm). Il possède une durée de vie très courte (quelques µs dans l'eau et 25 à 100 µs dans les milieux organiques non polaires) mais est très réactif et susceptible de réagir avec des substrats cellulaires situés dans son environnement proche (distance comprise entre 10 et 45 nm) (Foote *et al.*, 1984). Un grand nombre de substrats cellulaires tels que les acides aminés (cystéine, histidine, tryptophane, tyrosine et méthionine), les nucléosides (principalement la guanine) et les lipides insaturés peuvent réagir avec l'oxygène singulet (Davies, 2004).

L'oxygène singulet peut également réagir avec le PS à l'état fondamental pour former des produits d'oxydation, dits photoproduits (phénomène de photoblanchiment ou de photomodification), dont certains peuvent eux-mêmes être phototoxiques. Ce phénomène se caractérise par une extinction plus ou moins rapide de la fluorescence du PS en imagerie.

Il a souvent été rapporté que les réactions de type II étaient prépondérantes lors du processus de PDT (Dougherty *et al.*, 1998). Par conséquent, seule cette classe de réaction sera abordée par la suite.

I.3 Le photosensibilisateur idéal

Les PSs de première génération sont des dérivés d'hématoporphyrine (HpD, Photofrin® I et II). Synthétisés dans les années 70, ces dérivés de porphyrine ne sont pas purs et présentent une faible sélectivité pour les tissus cibles, associée à une faible clairance (Dougherty et Mang, 1987).

L'utilisation de PSs de première génération présente de nombreux inconvénients qui ont conduit à la définition du PS idéal, devant posséder les caractéristiques chimiques, photophysiques et biologiques répertoriées ci-dessous :

- **Pureté** chimique, composition constante, facilité de synthèse ;
- **Toxicité à l'obscurité faible,** voire nulle ;
- **Caractéristiques photophysiques spécifiques :**
  - **coefficient d'extinction molaire élevé,** à des longueurs d'onde situées dans la «fenêtre thérapeutique», c'est-à-dire dans la région **rouge** du spectre de la lumière visible, voire dans le proche infrarouge (600-850 nm) (Figure 2), afin de permettre une pénétration tissulaire et une absorption de lumière par le PS optimales ;
  - **bon rendement quantique en oxygène singulet.** Pour ce faire, le rendement quantique de formation de l'état triplet du PS doit être élevé ; la durée de vie de $^3PS_1$* doit être élevée, et son énergie suffisante pour permettre le transfert d'énergie à l'oxygène ;
- **Solubilité** en milieu aqueux, afin de faciliter l'administration systémique ;
- **Clairance élevée** ;
- **Sélectivité** pour le tissu tumoral.

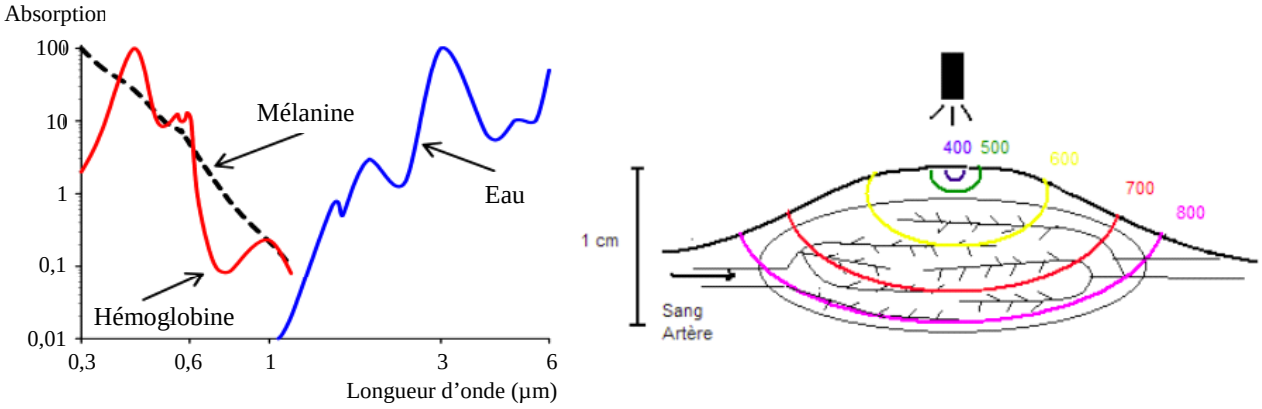


Figure 2 : Pénétration de la lumière dans les tissus.

A gauche : Spectres d'absorption des principales molécules biologiques. *A droite* : Profondeur de pénétration de la lumière dans un tissu en fonction de la longueur d'onde (en nm).

Afin de se rapprocher des caractéristiques de ce PS idéal, de nouveaux PS, dits de 2ème génération, ont été élaborés. Une majorité de PSs testés en clinique possèdent une structure tétrapyrrolique. Ces PSs sont principalement des dérivés de chlorine, bactériochlorine ou phthalocyanine. Ce sont des composés purs avec notamment une bande d'absorption se situant entre 650 et 800 nm.

Les principaux PSs utilisés en PDT ayant obtenu une AMM sont présentés dans le Tableau 1. Les structures chimiques des PSs utilisés en clinique ou en essais sont présentées dans la Figure 3.

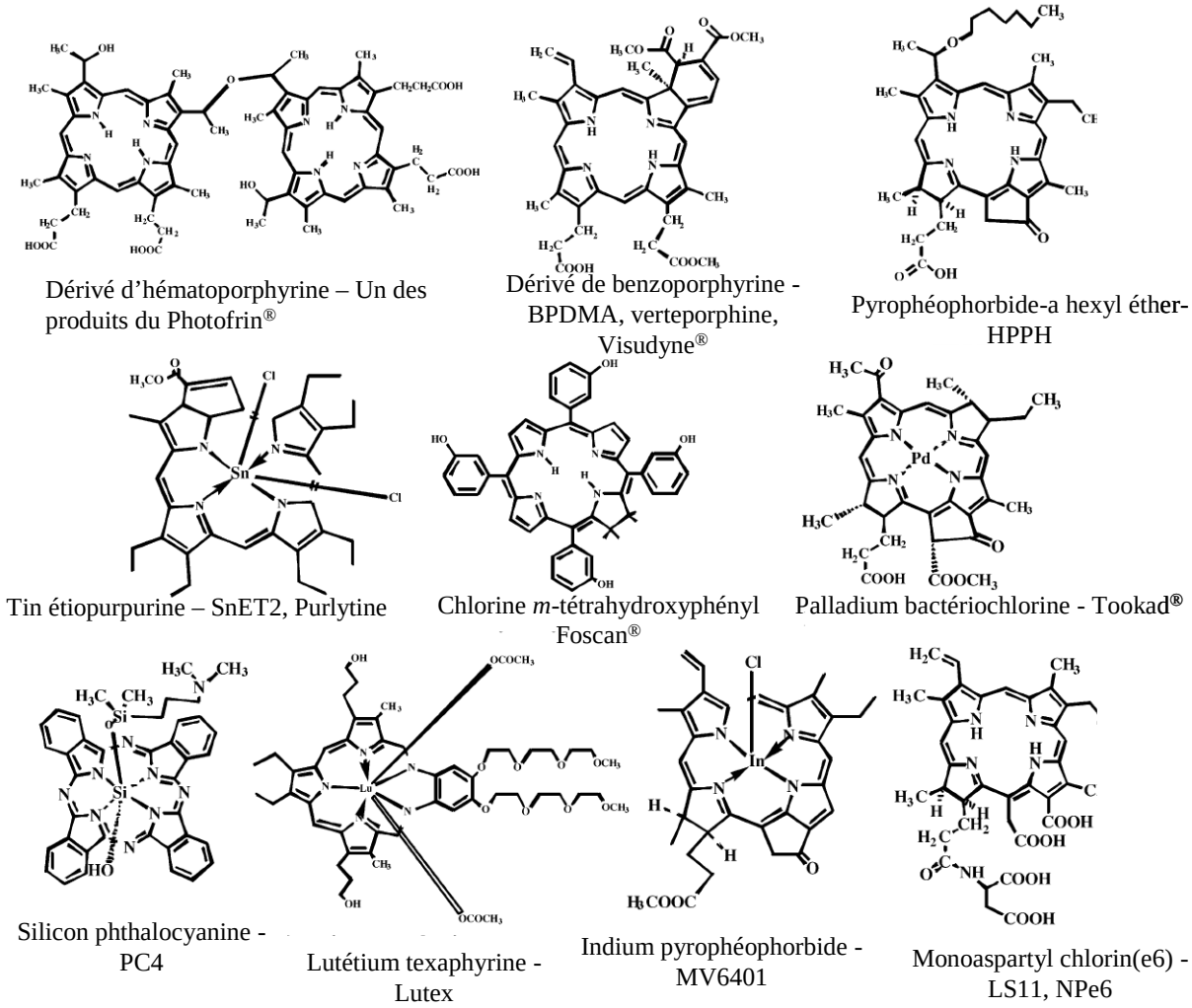


Figure 3 : Structures chimiques des principaux PSs.

D'après Castano *et al.*, 2004

Tableau 1 : Caractéristiques des principaux PSs ayant une AMM.

Molécule	$\lambda_{max\ absorption}$	Dose de PS (mg/kg)	Intervalle Drogue-Lumière (h)	Fluence (J/cm^2), Irradiance (mW/cm^2)	Indications
Porfimer sodium (Photofrin®, Axcan Pharma)	630 nm	2	48-72	100-200	Rechute de cancer du poumon non à petites cellules et de l'œsophage (AMM en France en 1996)
Acide 5-aminolévulinique/ALA (Levulan®, DUSA Pharmaceuticals) et ses esters (Metvix®, Photocure), précurseurs de la Protoporphyrine IX (PpIX)	635 nm (PpIX)	20 %, topique	3-6	100-150	Levulan® : kératoses actiniques (approuvé par la FDA en 2000) ; Metvix® : kératoses actiniques et carcinome basocellulaire (AMM européenne en 2000)
Chlorine *m*-tétrahydroxyphényl (*m*THPC) ou Témoporfine (Foscan®, Biolitec)	652 nm	0,1-0,15	96	10-20, 100	Cancers de la tête et du cou (AMM en Europe, Norvège et Islande en 2001)
Dérivé de benzoporphyrine BPDMA ou Verteporfin (Visudyne®, Novartis)	690 nm	0,2-0,6	0,1-0,25	50-100, 600	DMLA dans sa forme exsudative (AMM en Europe en 2002)

D'après Triesscheijn *et al.*, 2005

Le plus souvent, le développement d'agents photosensibilisants consiste à élaborer des composés qui vont naturellement créer des dommages sélectifs vis-à-vis des cellules tumorales. Bien que la majorité des PSs ne s'accumule pas dans les cellules cancéreuses de façon sélective, la plupart des études précliniques démontre que les PSs sont présents dans les tissus tumoraux en quantité beaucoup plus importante que dans les muscles et la peau (Boyle et Dolphin, 1996). La prolifération rapide des tumeurs et leur physiologie anormale (*e.g.* faible drainage lymphatique, fenestration des vaisseaux tumoraux, diminution du pH à des valeurs acides causée par une augmentation du métabolisme des sucres, augmentation du nombre de récepteurs aux LDLs (*low density lipoproteins*), abondance des macrophages) semblent jouer un rôle (Brown *et al.*, 2004).

Contrairement aux vaisseaux sanguins normaux, les néo-vaisseaux tumoraux sont plus perméables ce qui facilite l'épanchement des molécules à travers l'espace interstitiel des tumeurs. Grâce à l'augmentation de perméabilité et de rétention (*Enhanced Permeability and Retention*, EPR), les agents thérapeutiques sont capables de s'accumuler dans les tissus tumoraux (Maeda, 2001). Bien que la plupart des PSs soient des petites molécules, ils se fixent généralement aux protéines plasmatiques (Tableau 2) et se comportent ainsi comme des macromolécules. Une fois que les PSs sont passés à travers la membrane interstitielle tumorale, il leur est nécessaire de s'associer aux membranes ou d'être internalisés dans les cellules cancéreuses pour générer une phototoxicité. Les propriétés photophysiques des PSs et leur capacité à se fixer aux protéines plasmatiques jouent un rôle important pour déterminer

de quelle façon et avec quelle intensité les PSs s'incorporent dans le tissu tumoral. Ainsi, les PSs hydrophobes ont tendance à se fixer aux LDL et peuvent ainsi intégrer les cellules *via* les mécanismes d'endocytose LDL-récepteurs dépendants (Jori et Reddi, 1993 ; Bonneau *et al.*, 2002 ; Bonneau *et al.*, 2007)

Tableau 2 : Distribution *in vitro* et *in vivo* des photosensibilisateurs liés aux protéines et lipoprotéines sériques.

Photosensibilisateur	Distribution des PS (% de PS injecté) *in vivo*			Références
	Lipoprotéines	Grosses protéines	Forme libre (agrégée)	
Hématoporphyrine	21	75	4	Jori, 1989 ; Kongshaug, 1992
Dérivé d'hématoporphyrine	23	60	17	
Tétraphénylporphine tétrasulfonate	5	94	1	
N-Aspartyl chlorine e6	35	65	-	Kessel, 1997
	% de PS fixé aux protéines du plasma humain (études *in vitro*)			
	LDL	HDL	Grosses protéines	
Hématoporphyrine	15	82	3	Kessel, 1989
Dérivé d'hématoporphyrine	20	59	21	Kongshaug, 1992
Chlorine e6	1	58	41	Kessel, 1989
N-Aspartyl chlorine e6	1	13	86	Woodburn et Kessel, 1995
Al(III) phthalocyanine disulfonate	13	39	48	Kongshaug *et al.*, 1990
Tétraphénylporphyrine tétrasulfonate	3	14	81	Kessel *et al.*, 1987
Triphénylporphyrine tétrasulfonate	6	18	73	Kessel *et al.*, 1987
m-tétrahydroxyphényl chlorine	12	13	75	Hopkinson *et al.*, 1999

D'après Sobolev *et al.*, 2000

Bien que les PSs de deuxième génération présentent de nombreuses qualités photodynamiques par rapport aux PSs de première génération, des progrès restent à faire pour améliorer leur sélectivité vis-à-vis des tissus tumoraux. Ceci a conduit à l'élaboration de PSs de 3ème génération, PSs de 2ème génération modifiés de manière à cibler de façon passive (vectorisation) ou active (adressage) les cellules tumorales.

Les PSs de 3ème génération seront décrits plus en détail dans la partie IV du Chapitre I qui traite du ciblage des PSs.

I.4 Mécanismes de l'éradication tumorale après thérapie photodynamique

Trois mécanismes contribuant à l'éradication tumorale ont été identifiés (Figure 4) :

- Un **effet direct** de destruction des **cellules tumorales** par nécrose, apoptose ou autophagie ;
- Un **effet indirect** par destruction de la **vascularisation tumorale** provoquant une privation de la tumeur en nutriments et oxygène et par conséquent, la destruction tumorale ;
- Un effet indirect dû à une **réponse inflammatoire et immunitaire** de l'hôte.

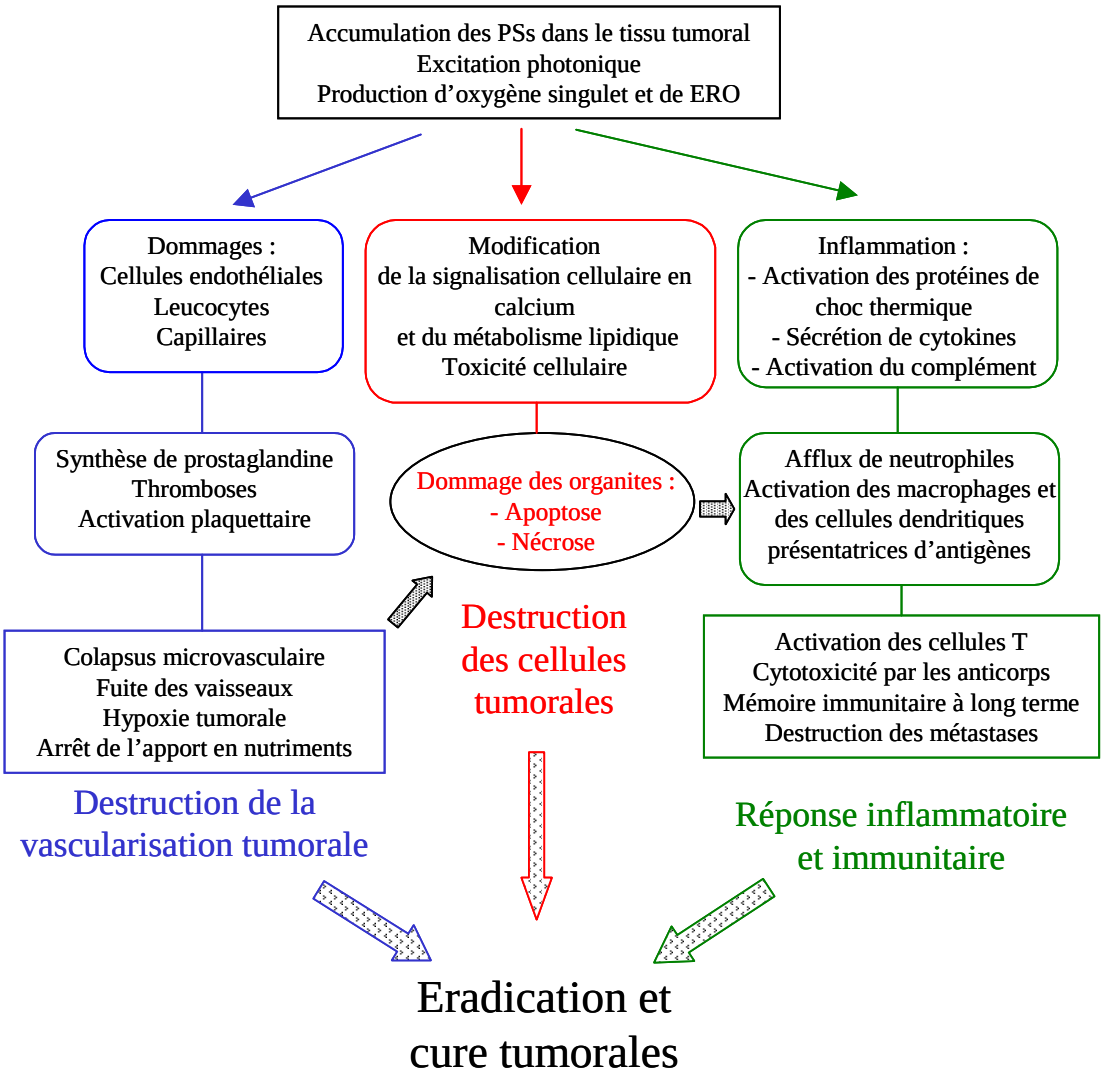


Figure 4 : Mécanismes de destruction tumorale après PDT.

D'après Castano *et al.*, 2005a

La prépondérance de l'un ou l'autre de ces effets dépend du type de tumeur, du PS (caractéristiques pharmacocinétiques, localisation intratissulaire et intracellulaire, etc.) et des conditions de PDT utilisées (Piette *et al.*, 2003). Ces trois mécanismes peuvent être combinés et interagirent entre eux, mais l'importance de chacun d'eux pour l'éradication tumorale reste encore à définir. En revanche, il a été démontré que la combinaison de ces trois phénomènes est indispensable pour une éradication tumorale optimale à long terme (Dougherty *et al.*, 1998).

I.4.1. Effets directs

Suivant le protocole de PDT, une fraction plus ou moins importante de PS peut être présente dans les cellules tumorales au moment de l'irradiation. Les espèces cytotoxiques produites vont alors causer des dommages cellulaires, conséquence de l'altération des fonctions des organites cellulaires et des systèmes membranaires. Les dommages se traduisent par deux effets principaux : la nécrose et l'apoptose. La concentration, les propriétés physicochimiques, la localisation subcellulaire du PS, la concentration en oxygène, l'intensité de la lumière, et le type cellulaire peuvent influencer le mode de mort cellulaire (Piette *et al.*, 2003 ; Castano *et al.*, 2005b).

La **nécrose** est une forme rapide et violente de dégénération. C'est une mort non programmée et accidentelle causée par des dommages physiques ou chimiques sévères. Elle se manifeste par le gonflement du cytoplasme, une destruction des organites et une peroxydation lipidique provoquant la désorganisation de la membrane plasmique. Les enzymes cytoplasmiques et lysosomales ainsi libérées sont à l'origine de réactions inflammatoires.

L'**apoptose**, ou **mort cellulaire programmée,** est le processus par lequel des cellules déclenchent leur autodestruction en réponse à des signaux intra- et extra-cellulaires (*e.g.* libération de cytochrome c et *tumor necrosis factor* α, TNFα). C'est une mort cellulaire physiologique, génétiquement programmée, nécessaire à la survie des organismes pluricellulaires. Elle est en équilibre constant avec la prolifération cellulaire. Contrairement à la nécrose, elle ne provoque pas d'inflammation : les membranes plasmiques ne sont pas détruites, et la cellule émet des signaux qui permettront sa phagocytose par des globules blancs, notamment des macrophages. La mitochondrie est considérée comme l'organite central de ce mécanisme. Elle va subir plusieurs modifications majeures comme le relargage du cytochrome *c* dans le cytoplasme ou la diminution du potentiel membranaire. L'activation

de caspases effectrices (*e.g.* caspase-3) qui en résulte (Agostinis *et al.*, 2004) induit l'autodestruction cellulaire en clivant des composantes essentielles au maintien de la vie cellulaire. Le noyau se condense, puis la chromatine est clivée en fragments réguliers d'environ 180 paires de bases. La membrane plasmique bourgeonne ce qui conduit à la formation de corps apoptotiques renfermant une partie du cytoplasme de la cellule. Ces derniers sont ensuite phagocytés par des cellules voisines ou des monocytes. L'intégrité de la membrane plasmique n'est jamais altérée au cours du processus, ce qui permet d'éviter tout déversement du contenu cellulaire.

De récentes études ont montré l'implication d'un autre type de mort cellulaire programmée suite à la PDT, l'**autophagie**, du grec *autos* (soi-même) et *phagein* (manger) (Agostinis *et al.*, 2004 ; Kessel *et al.*, 2006). Cette autodigestion se fait par l'entremise des lysosomes, qui contiennent un grand nombre d'enzymes qui dégradent la plupart des macromolécules biologiques.

I.4.2. Effets indirects

I.4.2.1. Réactions immunitaires et inflammatoires

Les effets de la PDT anticancéreuse sur la réponse immunitaire se présentent sous deux aspects : l'activité antitumorale de la PDT induit, soit l'inflammation des cellules, soit une réponse immunitaire antitumorale à long terme. Ces effets peuvent être provoqués par des dommages cytotoxiques qui ne sont pas nécessairement létaux pour toutes les cellules tumorales et qui peuvent être à l'origine d'un stimulus inflammatoire. La PDT induit des modifications de la membrane plasmique et des membranes des organites cellulaires en activant les phospholipases membranaires (Agarwal *et al.*, 1993). Ainsi, les phospholipides sont rapidement dégradés et les médiateurs de l'inflammation sont déversés massivement dans le milieu extracellulaire (Yamamoto *et al.*, 1991). La PDT peut notamment induire une augmentation des taux circulants d'interleukine-1β, (IL-1b) IL-6, MIP (*macrophage inflammatory protein*)-1 et 2 et G-CSF (*granulocyte colony-stimulating factor*) (de Vree *et al.*, 1997 ; Gollnick *et al.*, 2003).

Les signaux inflammatoires post-PDT initient une invasion massive de neutrophiles, de mastocytes, de monocytes mais également de macrophages (Krosl *et al.*, 1995). Les macrophages sont capables de phagocyter les débris cellulaires et peuvent fonctionner comme cellules présentatrices d'antigènes (Germain, 1981).

Les épitopes présentés en surface des macrophages peuvent être reconnus par des lymphocytes T CD_4^+. Ces lymphocytes ainsi activés activent à leur tour des lymphocytes T CD_8 cytotoxiques qui peuvent détruire spécifiquement les cellules porteuses de ces épitopes. La réponse immunitaire systémique qui s'en suit peut alors induire la destruction des cellules tumorales restantes ou la prévention de métastases, par développement d'une réponse immunologique à mémoire, ouvrant la voie à la vaccination *in situ* (Gomer *et al.*, 1987 ; Schreiber *et al.*, 2002).

I.4.2.2. Effets anti-vasculaires

L'effet anti-vasculaire de la PDT consiste en des dommages vasculaires survenant après PDT et contribuant à long terme à l'éradication tumorale (Abels, 2004).

Le degré de réponse vasculaire est fortement dépendant des conditions de PDT utilisées, en terme de quantité de PS administrée, d'intervalle drogue-lumière et de dose de lumière (Wieman *et al.*, 1988 ; Fingar *et al.*, 1992 ; McMahon *et al.*, 1994 ; Fingar *et al.*, 2000).

Le collapsus vasculaire peut être rapidement observé après PDT et peut provoquer une hypoxie tumorale post-PDT persistante et sévère (Dougherty *et al.*, 1998). La PDT peut aussi provoquer une vasoconstriction, une fuite des macromolécules depuis les vaisseaux, l'adhésion de leucocytes et la formation de thrombi, ces évènements étant tous liés à l'activation plaquettaire et à la libération de thromboxane (Fingar *et al.*, 1993). Ces effets sont dus aux dommages directs des cellules endothéliales. La PDT peut également provoquer une vasoconstriction par inhibition ou relarguage d'oxyde nitrique (NO) par l'endothélium (Gilissen *et al.*, 1993). Ces deux événements initiateurs potentiels de l'effet anti-vasculaire (dommages aux cellules endothéliales et vasoconstriction) conduisent à une destruction tumorale par collapsus vasculaire, arrêt du flux sanguin ou hémorragie (Krammer, 2001).

Plusieurs stratégies peuvent être utilisées pour potentialiser l'effet anti-vasculaire de la PDT, soit en agissant sur le protocole de traitement, soit en utilisant des PSs ayant un mode d'action vasculaire.

Ces stratégies de *Vascular Targeted Photodynamic therapy* (VTP) ont des applications pour le traitement de la dégénérescence liée à l'âge (Schmidt-Erfurth et Pruente, 2007), les angiomes plans (Mordon, 2007) et le traitement du cancer de la prostate (Eggener et Coleman, 2008). La VTP pour le traitement du cancer sera décrite plus en détail dans les chapitres ciblage vasculaire passif (Chapitre I. IV.1.2) et actif (Chapitre I. IV.2.2).

II. L'angiogenèse tumorale

II.1 Définition et mécanismes de l'angiogenèse tumorale

II.1.1. Généralités

L'angiogenèse tumorale est définie comme la formation de nouveaux vaisseaux, à partir de vaisseaux préexistants, sous l'influence directe ou indirecte d'un foyer tumoral. La vasculogenèse, quant à elle, est définie comme la formation directe de néovaisseaux à partir de précurseurs mésenchymateux. L'angiogenèse tumorale n'est qu'un cas particulier d'angiogenèse.

Dans des conditions physiologiques normales, cette néovascularisation est finement contrôlée et joue un rôle fondamental dans les fonctions reproductrices (régénération de l'utérus, formation du corps jaune et du placenta), le développement embryonnaire, la réparation tissulaire (cicatrisation), l'ossification endochondrale, la reperméabilisation des thromboses et l'adaptation musculaire à l'exercice physique. C'est un mécanisme indispensable et hautement régulé dans des conditions physiologiques (Risau, 1997).

L'angiogenèse peut cependant devenir pathologique lorsque la croissance de nouveaux capillaires devient incontrôlée. La néovascularisation excessive peut alors concourir au développement et à la progression de maladies variées, notamment inflammatoires (Folkman, 1995), telles que les rétinopathies diabétiques, la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA), les hémangiomes, le sarcome de Kaposi, les glaucomes, l'arthrite rhumatoïde, l'athérosclérose, le psoriasis, l'obésité, la maladie d'Alzheimer ou le cancer (Carmeliet, 2003).

Le **mécanisme angiogénique** est initié par la survenue d'une rupture de l'équilibre entre les facteurs pro-angiogéniques et anti-angiogéniques dans l'environnement tumoral en faveur des facteurs pro-angiogéniques. Cet événement clef de la tumorigenèse est appelé le ***switch* angiogénique.** Il correspond au passage de la **phase dormante** ou **avasculaire** à la phase **vasculaire (**Bergers et Benjamin, 2003).

Pendant la phase dormante, la tumeur, d'une taille inférieure à 1-2 mm^3, est indépendante de l'angiogenèse et les apports en oxygène et en nutriments aux cellules tumorales sont assurés par diffusion simple (Folkman, 1990). Durant la phase vasculaire, la croissance tumorale est accélérée. La survie et la prolifération anarchique des cellules cancéreuses sont favorisées par la présence des néovaisseaux.

Trois mécanismes fondamentaux de l'angiogenèse ont été identifiés : l'**intussusception (**Djonov *et al.*, 2003), la **septation** et le **bourgeonnement** (*sprouting*). L'angiogenèse intussusceptive est caractérisée par un élargissement et une séparation de vaisseaux déjà formés. Au cours de la septation, les cellules endothéliales se développent à l'intérieur des vaisseaux pour créer des canaux vasculaires séparés. Seule l'angiogenèse par **bourgeonnement** (*sprouting*), qui est la plus largement décrite, sera détaillée.

Quel que soit le stimulus physiologique ou pathologique initial, les étapes morphologiques du processus angiogénique sont identiques à l'échelle tissulaire. Seuls les mécanismes cellulaires et moléculaires peuvent être légèrement différents. D'une façon générale, les mécanismes permettant aux cellules endothéliales de migrer vers le foyer tumoral sont très comparables à ceux mis en jeu par les cellules tumorales malignes lors de processus invasifs (Scoazec, 2000).

II.1.2. Initiation de l'angiogenèse

L'angiogenèse est rapidement initiée en réponse au microenvironnement hypoxique avec l'intervention de HIF-1α (*Hypoxia inducting factor*) (Shweiki *et al.*, 1992), ou suite à l'activation d'oncogènes (Folkman, 2003). Chacun de ces évènements se traduit par l'induction de l'expression et de la sécrétion de facteurs pro-angiogéniques, dont le VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), par les cellules tumorales ou stromales. Le VEGF induit une vasodilatation des capillaires, *via* la production de NO, et une augmentation de la perméabilité vasculaire. Cette dernière permet l'extravasation de protéines plasmatiques qui forment alors dans le tissu, une couche matricielle sur laquelle les cellules endothéliales activées pourront migrer ultérieurement (Nagy *et al.*, 2002).

II.1.3. Bourgeonnement : dégradation de la membrane basale

Le bourgeonnement correspond à l'apparition de petites masses de cellules endothéliales sur la face externe des vaisseaux préexistants situés à proximité du foyer tumoral.

Le plasminogène extravasé dans le milieu périvasculaire est transformé en plasmine sous l'action des activateurs du plasminogène : l'urokinase (uPA) et l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA). La plasmine active ensuite des métalloprotéinases (MMPs, *matrix metallo proteinases*, notamment MMP-2 et MMP-9), endopeptidases zinc-dépendantes sécrétées par les cellules tumorales, stromales et endothéliales. Ces enzymes vont permettre la

dégradation des composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, laminine, structures protéiques de protéoglycanes) et de la membrane basale. Les péricytes se détachent et les jonctions entre cellules endothéliales sont altérées. Cette dégradation locale de la matrice extracellulaire (MEC) permet aux cellules endothéliales de migrer. Le facteur de croissance fibroblastique basique (*fibroblast growth factor,* FGFb ou FGF-2), et certaines isoformes du VEGF sont alors être libérés.

II.1.4. Migration et prolifération des cellules endothéliales

Libérées de la MEC, les cellules endothéliales migrent en direction de la source du stimulus angiogénique (la tumeur), par chimiotactisme. Les principaux facteurs de croissance intervenant au cours de cette étape sont le FGFb et le VEGF (Griffioen et Molema, 2000). La fixation du VEGF à ses récepteurs exprimés au niveau des cellules endothéliales entraîne l'activation de ces dernières (Abedi et Zachary, 1997). Les cellules endothéliales activées synthétisent et sécrètent de nouvelles protéines extracellulaires (fibronectine, ténascine), qui sont également impliquées pour faciliter la migration cellulaire. Enfin, pour interagir avec les protéines de leur nouvel environnement, les cellules endothéliales activées expriment de nouveaux récepteurs à la MEC, notamment ICAM-1 *(intercellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*), les sélectines E et P et les intégrines (*e.g.* $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_5\beta_1$), absentes des cellules endothéliales quiescentes (Scoazec, 2000).

Sous l'influence du VEGF et du FGFb (*fibroblast growth factor basic*), les cellules endothéliales prolifèrent et donnent rapidement plusieurs générations de cellules filles nécessaires à la formation de nouveaux vaisseaux.

II.1.5. Remodelage vasculaire

Le remodelage vasculaire correspond à l'adaptation continue du réseau vasculaire aux besoins du foyer tumoral. En permanence, au sein des réseaux vasculaires péritumoraux, des capillaires disparaissent pendant que d'autres se développent rapidement, drainant à leur profit l'essentiel du flux circulatoire sanguin. De plus, de nouveaux bourgeons capillaires formés lors de phases successives de stimulation angiogénique fusionnent avec les capillaires préexistants.

Au terme de la migration, les capillaires néoformés entrent dans une phase de stabilisation qui aboutit à la réorganisation de la paroi vasculaire. La mise en place de la paroi vasculaire est caractérisée par la formation d'une lame basale riche en laminine et en

collagène IV ainsi que par l'accolement de péricytes, résultant de la différenciation locale de cellules mésenchymateuses non spécialisées.

L'angiogenèse soutient la croissance de la tumeur en apportant l'oxygène et les nutriments nécessaires à son expansion, en produisant des facteurs qui stimulent la croissance des cellules cancéreuses ainsi qu'en leur fournissant leur principale voie pour coloniser d'autres organes (Folkman, 1995). Ces étapes sont résumées sur la Figure 5.

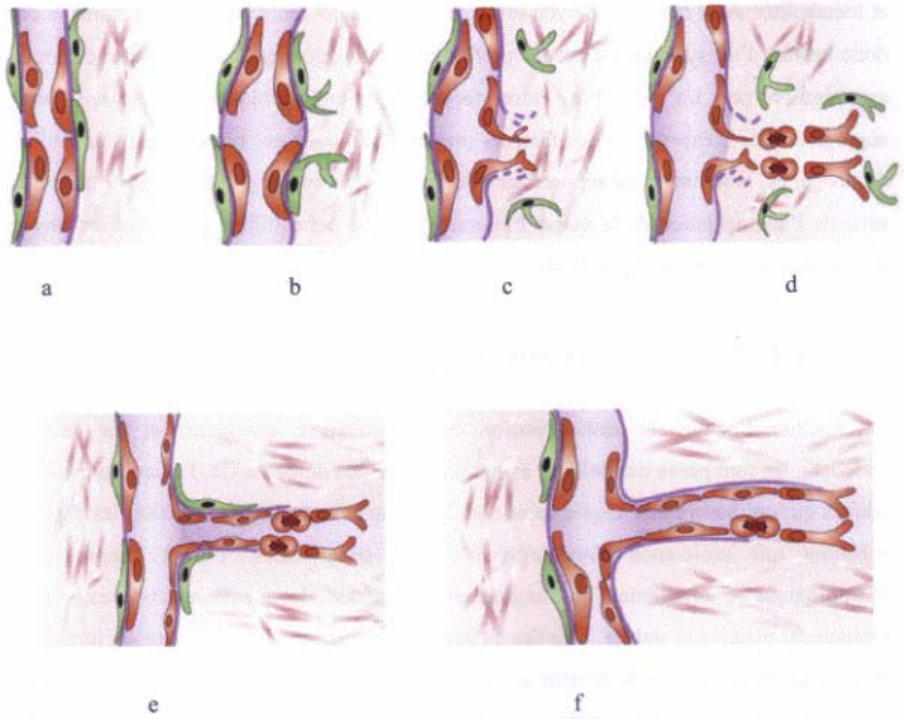


Figure 5 : Etapes de l'angiogenèse tumorale.

a : Vaisseau sanguin tumoral. **b** : Détachement des péricytes (vert) et dégradation de la membrane basale. **c** : Activation des cellules endothéliales (rouge) par le VEGF sécrété par les cellules tumorales. **d** : Migration des cellules endothéliales vers la tumeur. **e** : Prolifération des cellules endothéliales. **f** : Formation du néo-vaisseau, recrutement des composants de la paroi vasculaire par les cellules endothéliales. D'après Bergers et Benjamin, 2003.

II.2 Facteurs pro- et anti-angiogéniques

II.2.1. Inducteurs de l'angiogenèse

Les mécanismes cellulaires et moléculaires du processus angiogénique sont induits par l'action coordonnée de facteurs **pro-angiogéniques**. Les principaux facteurs sont présentés dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Principaux facteurs pro-angiogéniques.

	Induction de la prolifération des cellules endothéliales	Induction de la migration des cellules endothéliales	Induction de la différentiation des cellules endothéliales
Facteurs de croissance			
VEGF	+	+	+
PlGF	±	+	?
FGFa (FGF-1), FGFb(FGF-2)	+	+	+
PDGF	+	+	+
HGF/SF	+	+	+
TGFα	+	+	+
TGFβ	-	0	+
EGF	+	+	+
IGF-1	+	+	+
Médiateurs de l'inflammation			
TNFα	-	0	+
Interleukine -8	+	+	?
Interleukine -3	+	+	+
Prostaglandines E1, E2	0	0	+
Enzymes			
PD-ECGF/TP	0	+	?
Cyclooxygénase-2	0	+	+
Angiogénine	0	+	+
Facteurs hématopoïétiques			
Erythropoïétine	+	?	+
G-CSF	+	+	?
GM-CSF	+	+	?
Molécules d'adhésion			
VCAM-1	0	+	?
Sélectine-E	0	+	+
Autre			
Angiopoïétine- 1	0	+	+

Adapté d'après Scoazec, 2000 ; Liekens *et al.*, 2001 ; Fayette *et al.*, 2005.

Le **VEGF** est probablement le régulateur le plus important de l'angiogenèse dans des conditions aussi bien physiologiques que pathologiques. Ainsi, de nombreuses tumeurs surexpriment les récepteurs au VEGF (Ferrara, 2004a). La partie suivante (Chapitre I.III) est consacrée au VEGF et ses récepteurs.

Les **angiopoïétines** (Ang), essentiellement l'Ang1 et l'Ang2 jouent également un rôle essentiel dans l'angiogenèse. Les angiopoïétines participent plus particulièrement à la transformation et à la maturation des vaisseaux. Elles interviennent dans la régulation de la stabilité vasculaire. Le récepteur spécifique de l'**Ang1** est la protéine Tie2 (*Tunica internal endothelial cell kinase)* exprimée à la surface des cellules endothéliales. L'Ang1 fonctionne comme un agoniste et favorise la stabilisation des interactions des cellules endothéliales avec la matrice extracellulaire et les péricytes pendant la mise en place des vaisseaux sanguins. L'**Ang2** partage le même récepteur que l'Ang1 mais exerce des effets antagonistes de celle-ci (Scoazec, 2000). L'Ang2 coopère avec le VEGF pour induire l'angiogenèse en inhibant l'Ang1 qui maintient l'intégrité et la quiescence de l'endothélium. En revanche, en absence de

VEGF, l'inhibition de l'activité de Ang1 par Ang2 conduirait à un détachement des cellules endothéliales de la matrice et des péricytes, à leur mort et à la régression des vaisseaux (Mattot *et al.*, 1998).

Le **FGF-2** est un membre des FGF (*fibroblast growth factor*) basiques. *In vitro*, le FGF-2 stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales, c'est un puissant stimulant de l'expression des intégrines, nécessaires à la migration cellulaire. Le FGF-2 coopère avec le VEGF lors des phases de prolifération et de migration (Scoazec, 2000).

Le **TGFβ** (*transforming growth factor β)* exerce une action bi-phasique sur les cellules endothéliales *in vitro*, stimulatrice à faible concentration, inhibitrice à concentration importante. *In vivo*, le TGFβ semble être un stimulateur de l'angiogenèse tumorale. En effet, il joue un rôle dans l'induction de la différenciation des cellules endothéliales et dans la reconstruction de la lame basale vasculaire ainsi que dans la différenciation des péricytes (Scoazec, 2000).

Le **PDGF-B** (*platelet derived growth factor*) participe au recrutement des cellules mésenchymateuses.

Tous ces facteurs pro-angiogéniques sont ainsi impliqués dans la maturation des capillaires sanguins. Leur action est résumée dans la Figure 6.

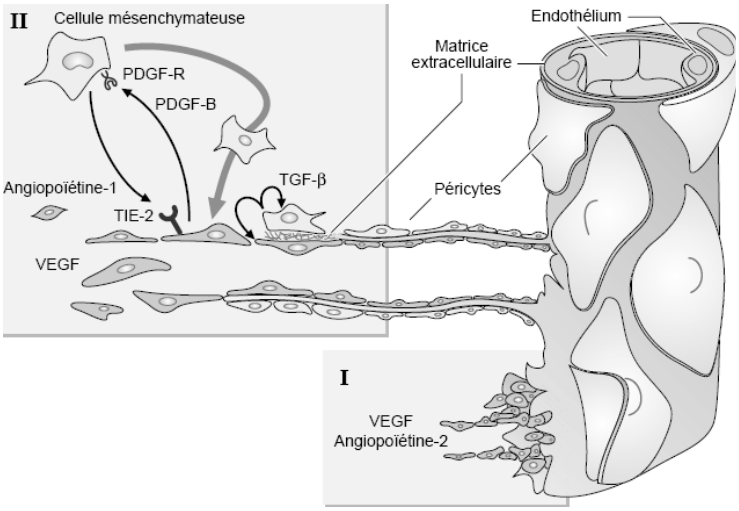


Figure 6 : Implication des facteurs angiogéniques dans la maturation des capillaires.

D'après Mattot *et al.*, 1998.
I. L'Ang-2 serait associée au bourgeonnement précoce de nouveaux vaisseaux en contribuant au relâchement des interactions entre cellules endothéliales, MEC et péricytes. Ce phénomène rendrait les cellules endothéliales sensibles à l'action du VEGF.
II. L'Ang-1, comme le PDGF-B, participerait au recrutement des cellules mésenchymateuses migrant vers le capillaire. TGF-β, activé lorsque les cellules endothéliales et mésenchymateuses se contactent, induit la différenciation de ces dernières en péricytes, inhibe la prolifération vasculaire et stimule la production de MEC. L'Ang-1 stabilise ensuite les interactions entre les différents types cellulaires et la MEC.

II.2.2. Inhibiteurs de l'angiogenèse

La liste des facteurs **anti-angiogéniques** est également très longue (Tableau 4). Ces facteurs possèdent une activité anti-angiogénique, soit parce qu'ils inhibent *in vitro* la prolifération et la migration des cellules endothéliales, soit parce qu'ils inhibent *in vivo* l'angiogenèse. Comme cela a été fait pour les activateurs de l'angiogenèse, uniquement les principaux facteurs seront décrits.

La **thrombospondine-1** (TSP1) est une protéine de la matrice extracellulaire se localisant préférentiellement au niveau périvasculaire. Elle contribue à la stabilisation des vaisseaux néoformés en bloquant leur migration et en facilitant la réorganisation de la lame basale (Figure 7). De nombreuses études ont démontré que la TSP1 est un inhibiteur puissant de l'angiogenèse *in vitro* et *in vivo* (Iruela-Arispe *et al.*, 2004).

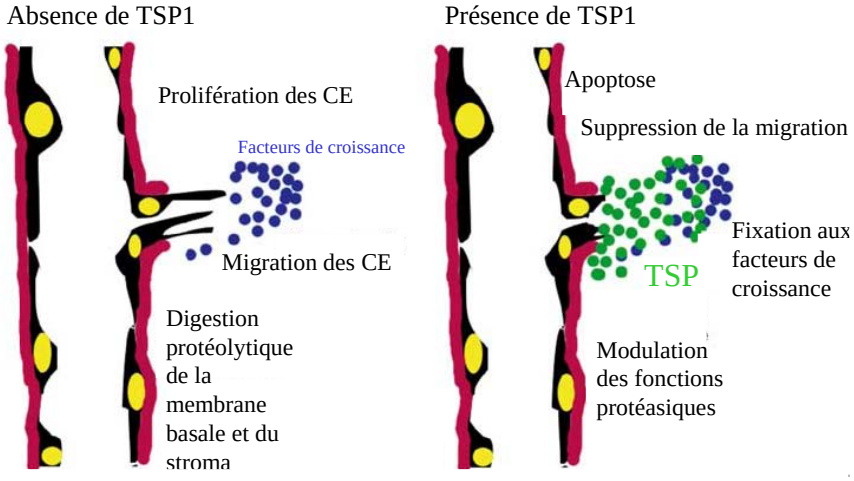


Figure 7 : Représentation schématique des effets de la thrombospondine sur les cellules endothéliales.

En absence de TSP1, la membrane basale vasculaire (en rouge), est dégradée et les cellules endothéliales (CE, en noir et jaune) migrent et prolifèrent en réponse aux facteurs de croissance (en bleu), permettant ainsi la croissance des vaisseaux. En présence de TSP1 (en vert), la croissance des vaisseaux est atténuée par divers mécanismes incluant l'activation de TGFβ, l'initiation de l'apoptose, la séquestration des facteurs de croissance et la suppression des protéases extracellulaires. D'après Iruela-Arispe *et al.*, 2004.

L'**angiostatine** est un fragment du plasminogène dont l'action est principalement endothéliale. Ce facteur a une action inhibitrice sur le développement des métastases latentes.

L'**endostatine** est un inhibiteur de l'angiogenèse et de la croissance tumorale également identifié dans les cellules endothéliales (Bikfalvi, 2006).

Le **facteur plaquettaire 4** exerce son effet par inhibition de la liaison du FGF2 et du VEGF à leurs récepteurs. Il empêche aussi l'activation des récepteurs aux FGF par inhibition de la liaison et de la dimérisation du récepteur (Perollet *et al.*, 1998).

Les **PAI**s (*plasminogen activator inhibitors*) sont des inhibiteurs endogènes de uPA et tPA.

Les **TIMP**-1, -2, -3 et -4 (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) inhibent les MMPs (Klagsbrun et Moses, 1999).

Tableau 4 : Les principaux facteurs anti-angiogéniques

Inhibiteur	Mécanisme d'action
Fragments protéiques	
Angiostatine (fragment du plasminogène)	↓ prolifération, ↑ apoptose des cellules endothéliales (CE)
Endostatine (fragment du collagène XVIII)	↓ prolifération CE , ↑ apoptose CE
Fragment de l'anti-thrombine III	↓ prolifération CE , ↑ apoptose CE
Prolactine 16 kDa	↓ prolifération CE, ↓ angiogenèse induite par FGFb
Médiateurs solubles	
Thrombospondine-1	↓ prolifération CE , ↑ apoptose CE
Troponine-1	↓ prolifération CE
Interféron α	↓ prolifération CE, ↑ apoptose CE, ↓ angiogenèse induite par FGFb
Interféron γ	↓ prolifération CE
Facteur plaquettaire-4 (PF-4)	↓ prolifération CE, ↓ angiogenèse induite par FGFb et l'interleukine-8
Interleukine -12	↑ Interféron-γ
Interleukine -4	↓ migration CE
Inhibiteur du VEGF (VEGI)	↓ prolifération CE
TIMP	↓ activité MMP
PAI	↓ activité uPA
Acide rétinoïque	↓ migration CE
Angiopoïétine-2	↓ maturation des vaisseaux, antagoniste de l'angiopoïétine- 1

D'après Scoazec, 2000.

II.3 Caractéristiques des vaisseaux tumoraux

Les vaisseaux qui irriguent les tumeurs présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles différentes de celles des vaisseaux normaux (Figure 8). Leur architecture est souvent anarchique et leurs arborisations sont irrégulières. Leurs parois sont bordées de cellules endothéliales parfois fenêtrées, reposant sur une membrane basale souvent incomplète ou dissociée. Les péricytes, qui jouent un rôle important dans la régulation du flux circulatoire, sont rares voire absents. Il en résulte une augmentation de la perméabilité vasculaire et l'extravasation d'hématies. Enfin, les réseaux capillaires sont constamment dépourvus de sphincters précapillaires (Scoazec, 2000). L'absence de ces structures rend les réseaux capillaires associés aux tumeurs largement autonomes vis-à-vis des mécanismes

physiologiques de régulation de la microcirculation sanguine. C'est un moyen supplémentaire pour les tumeurs de s'affranchir des contraintes susceptibles d'être exercées par leur environnement.

Par ailleurs, contrairement à l'angiogenèse physiologique, l'angiogenèse tumorale est presque toujours associée à une forte réaction inflammatoire, qui peut également contribuer à la cascade angiogénique (Augustin, 1998).

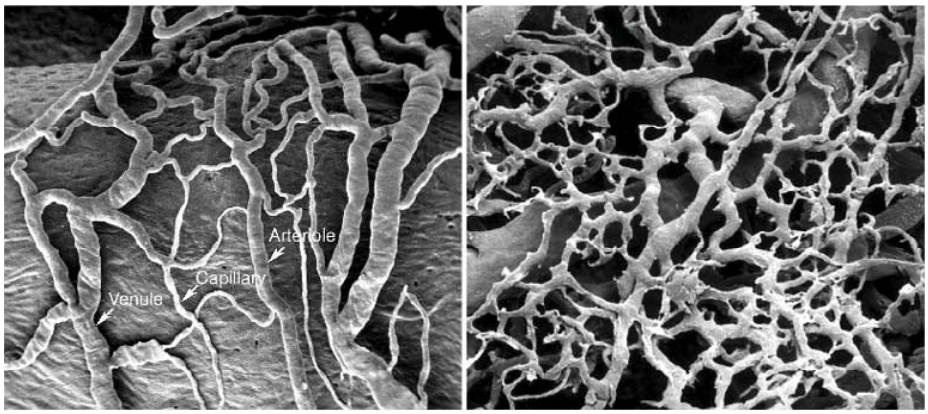


Figure 8 : Comparaison de l'aspect de vaisseaux sanguins normaux (*vasa vasorum* de sinus carotidien de rat, *gauche*) et tumoraux (xénogreffe de tumeur humaine chez la souris *nude*, *droite*), par microscopie électronique à balayage.
D'après Konerding *et al.*, 1995 ; McDonald et Choyke, 2003.

III. Le facteur de croissance endothélial vasculaire (VEGF)

III.1 Le VEGF et la famille du VEGF

Le terme VEGF (*vascular endothelial growth factor*) désigne une famille de gènes jouant un rôle fondamental dans la croissance et la différenciation des cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques. Cette famille contient différents membres parmi lesquels le VEGF-A (le VEGF proprement dit), le facteur de croissance placentaire (PlGF, *placenta growth factor*), et les VEGF-B, -C, -D et -E.

III.1.1. Le VEGF (ou VEGF-A)

Le VEGF ou VEGF-A est également connu sous le nom de VPF (v*ascular permeability factor*) ou vasculotropine.

III.1.1.1. Activités biologiques du VEGF

Le VEGF est un facteur de croissance indispensable à la régulation de l'angiogenèse physiologique et pathologique. C'est un facteur mitogène spécifique des cellules endothéliales. Il intervient dans la sécrétion et l'activation des protéases impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire. En agissant sur les cellules endothéliales, le VEGF induit l'expression de l'activateur et des inhibiteurs du plasminogène, du récepteur de l'urokinase et des métalloprotéinases. Il agit comme un facteur de survie des cellules endothéliales en inhibant l'apoptose et il est essentiel à la mobilisation des précurseurs de la moelle osseuse et des cellules endothéliales. Le VEGF induit la prolifération de ces dernières, stimule leur migration. Il augmente la perméabilité vasculaire, inhibe la différenciation des cellules dendritiques, induit le facteur tissulaire et la migration des monocytes (Ferrara et Davis-Smyth, 1997 ; Ferrara et Gerber, 2001)

Les principales fonctions du VEGF sont illustrées sur la Figure 9.

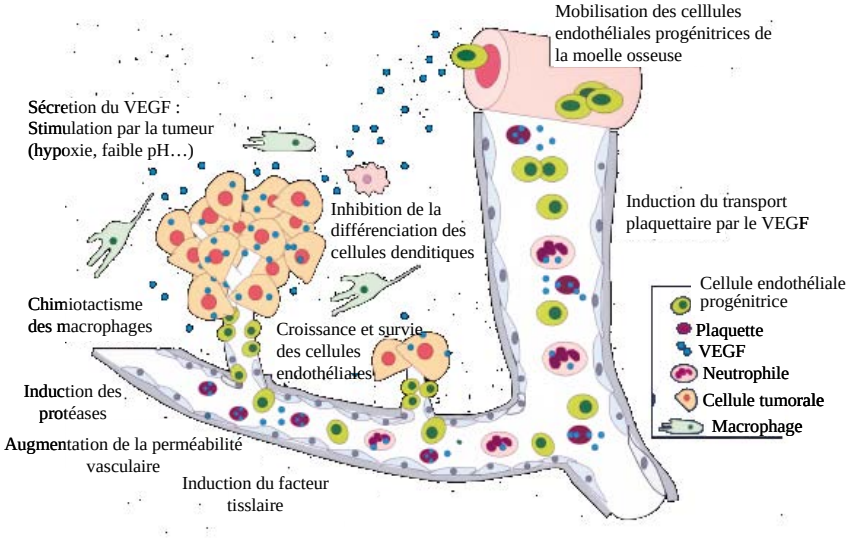


Figure 9 : Fonctions multiples du VEGF.

Le VEGF inhibe la différenciation des cellules dendritiques et induit le chimiotactisme des macrophages. Le VEGF induit la croissance et la survie des cellules endothéliales, le facteur tissulaire, les protéases, le transport plaquettaire. Il mobilise les cellules endothéliales progénitrices de la moelle osseuse et augmente la perméabilité vasculaire. D'après Toi *et al.*, 2001.

III.1.1.2. Régulation du VEGF

Régulation par l'hypoxie

La pression en oxygène joue un rôle majeur dans la régulation de l'expression du VEGF qui est induit lorsque le microenvironnement de la tumeur est hypoxique. Des travaux ont montré qu'il existe des similarités entre les mécanismes conduisant à l'induction du VEGF et celle de l'érythropoïétine, suite à l'exposition à de basses pressions partielles en oxygène (pO_2) (Goldberg et Schneider, 1994).

Le facteur de transcription HIF-1 est directement impliqué dans l'activation de la transcription du gène VEGF en condition hypoxique (Forsythe *et al.*, 1996). C'est un hétérodimère composé de deux sous-unités protéiques : la sous-unité HIF-1α et la sous-unité HIF-1β (ou ARNT1 pour *aryl hydrocarbon nuclear translocator 1*). Dans les cellules soumises à des conditions normoxiques, la sous-unité HIF-1β est présente de façon constitutive dans le noyau. A l'inverse, la sous-unité HIF-1α est maintenue à un taux très faible car elle est rapidement dégradée dans le cytoplasme (demi-vie < 5 minutes) par le protéasome. L'hydroxylation de HIF-1α est nécessaire pour que se fixe ensuite la protéine pVHL (*Von Hippel-Lindau*). Cette dernière appartient à un complexe enzymatique qui possède une activité E3-ubiquitine ligase. Ainsi, des conditions hypoxiques limitent

l'hydroxylation de HIF-1α, ce qui diminue la fixation de pVHL sur celle-ci, et empêche le protéasome de dégrader HIF-1α (Semenza, 2002). HIF-1α se dirige alors vers le noyau, où elle se fixe à HIF-1β, et forme le dimère HIF-1α/HIF-1β. Dans le noyau, le dimère se fixe sur les éléments de réponse à l'hypoxie (HRE) et active la transcription des gènes dont l'expression est dépendante de l'oxygène, notamment le VEGF. La régulation de HIF-1 est schématisée Figure 10.

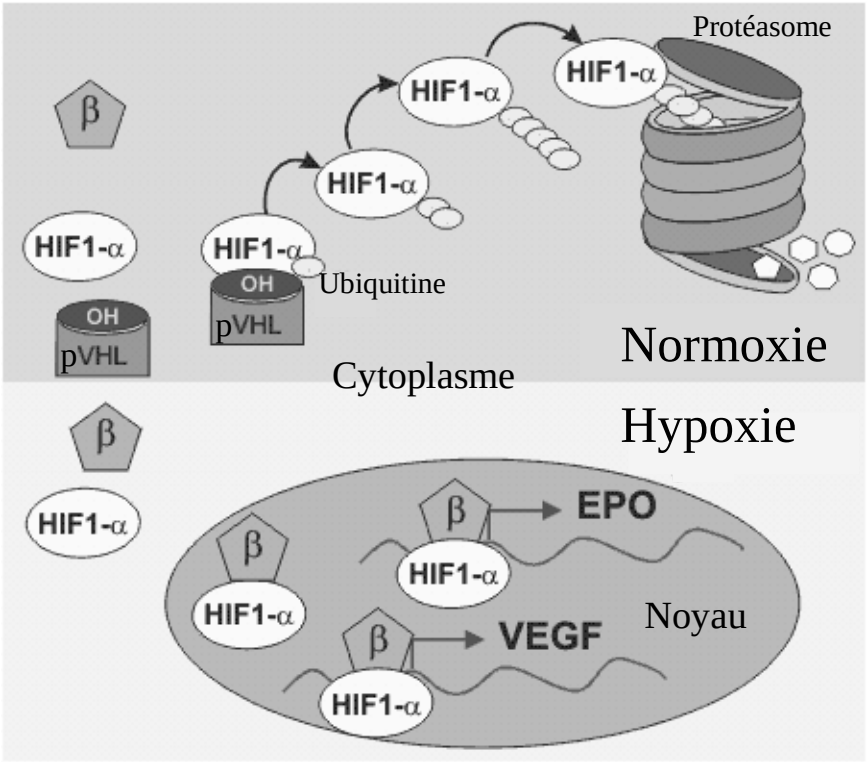


Figure 10 : Régulation de l'activité de HIF-1.

En condition de normoxie, la protéine HIF-1α est très instable. Elle fixe pVHL, après une hydroxylation dépendante de l'oxygène et du fer. HIF-1α est ubiquitinylée en normoxie puis dégradée par le protéasome. En condition d'hypoxie, HIF-1α n'est plus hydroxylée et ne fixe plus pVHL. Le signal hypoxique déclenche la translocation nucléaire de HIF-1α. Il peut alors se fixer à son partenaire HIF-1β pour activer des gènes sous la dépendance d'éléments de réponse à l'hypoxie (HRE). Enfin, l'hypoxie permet d'augmenter directement la capacité transcriptionnelle de HIF-1 *via* ses domaines transactivateurs. De retour en hypoxie, HIF-1α est rapidement dégradé, une étape pouvant être assurée par le protéasome nucléaire.

La stabilisation de la sous-unité HIF-1α peut également être induite en conditions normoxiques, par un mécanisme faisant intervenir la voie PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase)/Akt et le gène suppresseur de tumeur PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome TEN) (*Ferrara, 2004b). De plus, la surexpression du VEGF induite par l'hypoxie résulte non seulement d'une activité transcriptionnelle accrue, mais également d'une stabilisation importante de l'ARNm qui est synthétisé ; en conditions normoxiques, la

demi-vie de l'ARNm du VEGF est de 30-45 min, alors qu'elle est passe de 6 à 8 heures dans des cellules en conditions hypoxiques (Shima *et al.*, 1995).

Régulation par les facteurs de croissance, cytokines, hormones et oncogènes

Certains facteurs de croissance peuvent également induire la synthèse du VEGF, comme l'EGF (*epidermal growth factor*), le TGFα et le TGFβ, l'IGF-1, le FGFb ou encore le PDGF. Des cytokines inflammatoires (IL-1α, IL-1β, IL-6) peuvent aussi induire cette expression (Ferrara et Davis-Smyth, 1997).

Certaines hormones sont également des régulateurs importants de l'expression du VEGF dans divers types cellulaires ; il s'agit notamment de la thyréostimuline (Soh *et al.*, 1996), de la corticotropine (Shifren *et al.*, 1998), des gonadotropines (Schwarzenbach *et al.*, 2004), des oestrogènes (Cullinan-Bove et Koos, 1993 ; Mueller *et al.*, 2000) et de la progestérone (Mueller *et al.*, 2003). Enfin, des mutations au niveau du gène *ras* (Okada *et al.*, 1998) et de la voie de signalisation *Wnt* (Zhang *et al.*, 2001) semblent jouer un rôle dans l'expression du VEGF.

III.1.1.3. Structure et isoformes du VEGF

Le gène du VEGF humain est organisé en huit exons séparés par sept introns et se situe sur le chromosome 6p21.3. L'épissage alternatif de l'ARNm aboutit à la formation principalement de quatre isoformes possédant chacun 121, 165, 189 et 206 acides aminés ($VEGF_{121}$, $VEGF_{165}$, $VEGF_{189}$ et $VEGF_{206}$). Le $VEGF_{165}$ est la forme prédominante, il résulte de la perte de l'exon 6 alors que le $VEGF_{121}$ ne possède pas les exons 6 et 7. D'autres isoformes ont été décrits : le $VEGF_{145}$, $VEGF_{183}$ et $VEGF_{162}$ (Ferrara, 2004b) et un variant du $VEGF_{165}$ a récemment été identifié ($VEGF_{165b}$). Il s'agit d'une forme inhibitrice endogène du VEGF, ne comportant pas l'exon 8 (CDKPRR), qui est remplacé par l'exon 8b, appelé également exon 9 (SLTRKD). Le $VEGF_{165b}$ diminue la prolifération et la migration des cellules endothéliales induites par le VEGF. Bien qu'il puisse lier le VEGFR-2 (récepteur au VEGF de type 2) avec la même affinité que le $VEGF_{165}$, il n'induit pas une phosphorylation du récepteur ou l'activation d'une voie de signalisation (Woolard *et al.*, 2004). L'extrémité C-terminale du $VEGF_{165}$ contenue dans l'exon 8 est ainsi nécessaire pour la signalisation mitogénique.

Le $VEGF_{165}$ est une glycoprotéine homodimérique basique de 45 kDa se liant à l'héparine (présente au niveau de la MEC sous forme de protéoglycanes héparane-sulfate) du

fait des 15 acides aminés basiques parmi les 44 acides aminés de l'exon 7. Le $VEGF_{121}$ est une protéine acide et ne se fixe pas à l'héparine car il ne possède pas les exons 6 et 7. A l'inverse, les $VEGF_{189}$ et $VEGF_{206}$ qui possèdent les exons 6 et 7 ont un caractère plus basique et possèdent une meilleure affinité pour l'héparine. Ainsi, le $VEGF_{121}$ diffuse librement alors que les isoformes $VEGF_{189}$ et $VEGF_{206}$ sont complètement séquestrés dans la MEC et sont donc moins actifs que les isoformes solubles (121, 145 et 165). Les isoformes séquestrés dans la MEC peuvent être libérés sous forme de fragments solubles par l'héparine et les héparinases, par la plasmine (Yamazaki et Morita, 2006b) ou encore par certaines MMPs (MMP-3, 7, 9, 12,19) (Lee *et al.*, 2005).

III.1.2. Les autres membres de la famille du VEGF

Le **facteur de croissance placentaire** ou **PlGF** (*platelet growth factor*) est, comme le VEGF-A, une glycoprotéine homodimérique. Il a été découvert à l'origine dans du placenta humain et partage environ 50% de similarité avec le $VEGF_{165}$ (Maglione *et al.*, 1991). Il reconnaît VEGFR-1, mais pas VEGFR-2 (Sawano *et al.*, 1996). L'isoforme PlGF-2 peut se lier à l'héparine et aux co-récepteurs neuropiline-1 et neuropiline-2 (NRP-1 et NRP-2) (Maglione *et al.*, 1993). Le PlGF peut entrer en compétition avec le $VEGF_{165}$ pour la liaison au VEGFR-1 (Christinger *et al.*, 2004).

Le **VEGF-B** ou **VRF** (*VEGF-related factor*) est un ligand du VEGFR-1 et de NRP-1 et peut former un hétérodimère avec le VEGF (Olofsson *et al.*, 1999).

Le **VEGF-C** est produit comme une protéine précurseur qui peut être activée par des protéines intracellulaires PC5 et PC7 (*proprotein convertases*) (Olofsson *et al.*, 1999).

La forme mature du **VEGF-D** se fixe aux VEGFR-2 et 3. C'est un facteur mitogène des cellules endothéliales, angiogénique et lymphangiogénique (Tammela *et al.*, 2005).

Le **VEGF-E** a été identifié dans le génome d'un virus parapox (Orf, *open reading frame*) (Lyttle *et al.*, 1994). Il s'agit en fait d'un groupe de protéines, se liant tous au VEGFR-2, mais pas au VEGFR-1, ni au VEGFR-3. Le $VEGF\text{-}E_{NZ\text{-}2}$, le $VEGF\text{-}E_{NZ\text{-}10}$ et le $VEGF\text{-}E_{D1701}$, contrairement au $VEGF\text{-}E_{NZ\text{-}7}$ et au $VEGF\text{-}E_{VR634}$, peuvent se lier à NRP-1 (Tableau 5), par leur région C-terminale (Tokunaga *et al.*, 2006).

Le **VEGF-F** a été isolé à partir du venin de serpent. Il s'agit d'une famille de protéines, comprenant notamment le svVEGF (Junqueira de Azevedo *et al.*, 2001), le *Tf*svVEGF (Takahashi *et al.*, 2004), le facteur hypotensif HF (Komori *et al.*, 1999), ICPP (*increasing capillary permeability protein*) (Gasmi *et al.*, 2002) et la vammine (Yamazaki *et*

al., 2003). Ils se lient avec des affinités différentes au VEGFR-2, mais pas au VEGFR-3 ou à la NRP-1.

Tableau 5 : Affinité des membres de la famille du VEGF pour les récepteurs de cette famille (valeur des constantes de dissociation K_d en mol.L^{-1}).

Les signes - indiquent une absence de reconnaissance vers le récepteur ; les signes + traduisent une liaison au récepteur, sans précision sur l'affinité. N.D. : non déterminé.

	VEGFR-1	VEGFR-2	VEGFR-3	NRP-1	NRP-2	Héparine
VEGF-A$_{165}$				$1,8.10^{-10}$	$1,3.10^{-10}$	+
VEGF-A$_{121}$				+	+	-
VEGF-A$_{145}$	$1,0.10^{-11}$	$0,7\text{-}7,7.10^{-10}$	-	-	$7,0.10^{-10}$	+
VEGF-A$_{189}$				+	+	+
VEGF-A$_{206}$				+	+	+
PlGF-1	$1,9.10^{-10}$	-	-	-	-	-
PlGF-2	$2,5.10^{-10}$			+	+	+
VEGF-B$_{167}$	$10^{-11}\text{-}10^{-10}$	-	-	+	N.D.	+
VEGF-B$_{186}$				+		-
VEGF-C (précurseur)	-	$\sim 10^{-8}$	$\sim 10^{-9}$	-	-	-
VEGF-C (clivé)		$4,1.10^{-10}$	$1,4.10^{-10}$		+	
VEGF-D (précurseur)	-	$1,6.10^{-5}$	$8,2.10^{-7}$	-	-	-
VEGF-D (clivé)		$5,6.10^{-8}$	$2,0.10^{-8}$		+	
VEGF-E	-	$3,3.10^{-10}$	-	A divers degrés pour VEGF-E$_{NZ-2}$, VEGF-E$_{NZ-10}$, VEGF-E$_{D1701}$	N.D.	Selon isoforme
Vammine (VEGF-F1)	-	$4,1.10^{-10}$	-	-	N.D.	+
TfsvVEGF (VEGF-F2)	$\sim 10^{-11}$	10^{-9} - 10^{-8}	-	-	N.D.	+
Pm-VEGF (VEGF-F2)	$1,7.10^{-11}$	$6,5.10^{-9}$	-	-	N.D.	N.D.

D'après Yamazaki et Morita, 2006a

III.2 Les récepteurs au VEGF

Les VEGFR-1, VEGFR-2 sont des récepteurs au VEGF à activité tyrosine kinase (TK). Un troisième membre de cette famille, le VEGFR-3, qui n'est pas un récepteur du VEGF-A, est cependant reconnu par le VEGF-C ou le VEGF-D. Ces récepteurs à activité TK possèdent un domaine extracellulaire impliqué dans la reconnaissance et la fixation du ligand et sont composés de sept domaines à immunoglobuline (*Ig-like*), une région transmembranaire unique et un domaine intracytoplasmique à activité TK. D'autres récepteurs de la famille du VEGF, dépourvus d'activité TK, ont été identifiés. Il s'agit des neuropilines (NRPs), qui sont considérées comme jouant un rôle de co-récepteurs des isoformes du VEGF liant l'héparine (Tableau 6) (Soker *et al.*, 1998 ; Gluzman-Poltorak *et al.*, 2000).

Tableau 6 : La famille du VEGF et leurs récepteurs.

Formes physiologiques		VEGF-A VEGF-B PlGF	VEGF-A VEGF-C VEGF-D	VEGF-C VEGF-D	VEGF-A VEGF-B PlGF	VEGF-A PlGF VEGF-C
Formes exogènes	Virus		VEGF-E (VEGF viral)		VEGF-E (VEGF viral)	
	Venin de serpent	VEGF-F_2 (*Tf*svVEGF) VEGF-F_3 (bariétine)	VEGF-F_1 (vammine) VEGF-F_2 (*Tf*svVEGF) VEGF-F_3 (bariétine)		VEGF-F_3 (bariétine)	
		VEGFR-1 (Flt-1)	VEGFR-2 (Flk-1/KDR)	VEGFR-3 (Flt-4)	Neuropiline-1 (NRP-1)	Neuropiline-2 (NRP-2)

D'après Yamazaki et Morita, 2006b.

III.2.1. Les récepteurs à activité tyrosine kinase

Les ligands se fixent au niveau des domaines Ig-*like* des VEGF-R et induisent une dimérisation de deux récepteurs monomères (Fuh *et al.*, 1998). Chaque récepteur est alors activé par phosphorylation des résidus tyrosine (Y), au niveau de la portion intracytoplasmique, par la protéine kinase de l'autre monomère du récepteur (auto-/trans-phosphorylation). Il en résulte une cascade de transduction du signal (Figure 11).

Le domaine intracellulaire à activité TK est la partie où l'on retrouve le plus d'indentité entre VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3. Il contient une région juxta-membranaire, pouvant contenir des sites de phosphorylation sur Y, et ainsi servir de point d'ancrage à des molécules impliquées dans la signalisation. Le domaine catalytique possède l'activité TK et, est constitué de deux lobes, interrompus par une séquence spécifique, dénommée l'insert kinase. Enfin, l'extrémité C-terminale contient des résidus tyrosine

phosphorylables, et elle est impliquée également dans le recrutement de protéines de la signalisation.

Une fois phosphorylé, le récepteur ne peut plus être déphosphorylé. Pour stopper son action, la cellule va internaliser le récepteur par endocytose. La protéine va ensuite être dégradée dans un lysosome ou être recyclée à la surface de la cellule.

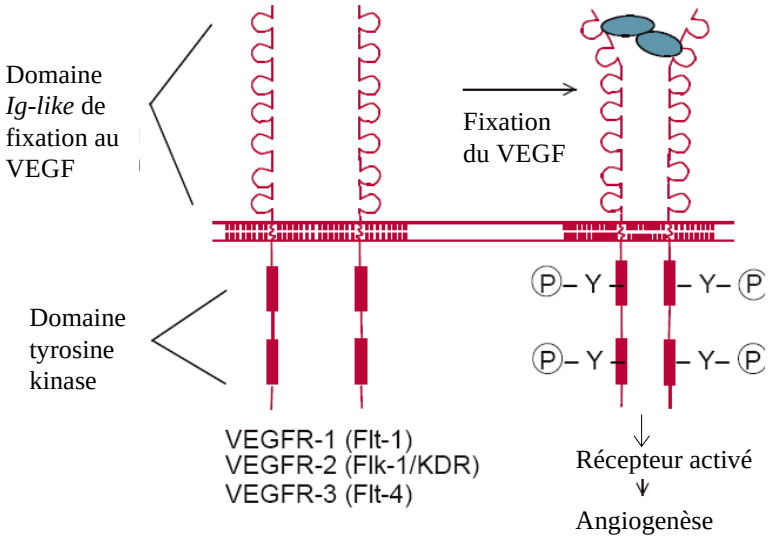


Figure 11 : Structure des récepteurs du VEGF à activité tyrosine kinase.
D'après McMahon, 2000

III.2.1.1. Le récepteur au VEGF de type 1 (VEGFR-1, Flt-1)

Le VEGFR-1 (Flt-1, *fms-like tyrosine kinase-1*) est un récepteur (210 kDa) de haute affinité pour le VEGF-A, VEGF-B et PlGF (Tableau 5 p.38). Son gène est situé sur le chromosome 13 chez l'homme. Il est exprimé par les cellules endothéliales vasculaires, mais aussi par des cellules non endothéliales, comme les macrophages et les monocytes (Barleon *et al.*, 1996 ; Clauss *et al.*, 1996 ; Sawano *et al.*, 2001), et les cellules souches hématopoïétiques (Takahashi *et al.*, 2004).

Le VEGF-A se lie au VEGFR-1 avec une affinité au moins 10 fois supérieure à celle pour le VEGFR-2 (Tableau 5) mais l'activité kinasique qui en résulte est inférieure (Ferrara et Davis-Smyth, 1997).

Le VEGFR-1 est impliqué dans la migration des cellules endothéliales. (Kanno *et al.*, 2000), des monocytes et macrophages (Sawano *et al.*, 2001), ainsi que dans le recrutement des cellules souches hématopoïétiques (Takahashi *et al.*, 2004).

Le VEGFR-1 peut former des hétérodimères avec le VEGFR-2, et ces derniers sont à l'origine de la transduction de signaux différents de ceux induits par les homodimères de VEGFR-1 ou de VEGFR-2 (Huang *et al.*, 2001 ; Neagoe *et al.*, 2005).

III.2.1.2. Le récepteur au VEGF de type 2 (VEGFR-2, KDR/Flk-1)

Le VEGFR-2 (KDR, *kinase domain-containing receptor*, homologue humain/Flk-1, *Fetal liver kinase-1*, homologue murin) est un récepteur (200-230 kDa) de haute affinité pour le VEGF-A, le VEGF-E et le VEGF-F, ainsi que pour les formes clivées de VEGF-C et VEGF-D (Tableau 5). Son gène est situé sur le chromosome 4 chez l'homme, et 5 chez la souris. Le VEGFR-2 est exprimé par les cellules endothéliales vasculaires et lymphatiques, ainsi que par d'autres types cellulaires, tels que les mégacaryocytes, les cellules souches hématopoïétiques (Katoh *et al.*, 1995) et les cellules musculaires lisses (CML) (Grosskreutz *et al.*, 1999 ; Ishida *et al.*, 2001). Il est considéré comme le principal médiateur des effets mitogéniques et chimiotactiques du VEGF-A. Il est indispensable au cours du développement embryonnaire (Shalaby *et al.*, 1995). Des études ont démontré son rôle dans la lymphangiogenèse (Nagy *et al.*, 2002 ; Hong *et al.*, 2004). Une forme soluble endogène du VEGFR-2 a également été détectée dans les plasmas humain et murin (Ebos *et al.*, 2004).

Suite à la liaison du VEGF au niveau du domaine extracellulaire de VEGFR-2, le récepteur est dimérisé, et des résidus tyrosine du domaine intracellulaire sont phosphorylés. Les signaux intracellulaires induits sont divers. Flk-1/KDR stimule la prolifération cellulaire (Hicklin et Ellis, 2005). Les effets de KDR sont essentiellement tournés vers l'angiogenèse incluant la perméabilité microvasculaire, la prolifération, l'invasion, la migration et la survie des cellules endothéliales.

III.2.1.3. Le récepteur au VEGF de type 3 (VEGFR-3, Flt-4)

Le VEGFR-3 (195 kDa) est un récepteur de haute affinité pour le VEGF-C et le VEGF-D ; c'est le principal récepteur impliqué dans la lymphangiogenèse. Son gène est situé sur le chromosome 5 chez l'homme. Contrairement au VEGFR-1 et au VEGFR-2, le VEGFR-3 est clivé par protéolyse au niveau du cinquième domaine Ig-*like* et les fragments générés restent assemblés par un pont disulfure (Lohela *et al.*, 2003).

Chez l'embryon, le VEGFR-3 est initialement présent sur tous les vaisseaux (sanguins et lymphatiques), mais cette expression se limite ensuite aux vaisseaux lymphatiques (Kaipainen *et al.*, 1995). Le VEGFR-3 joue un rôle important dans le développement cardio-vasculaire chez l'embryon (Dumont *et al.*, 1998). Chez l'adulte, le VEGFR-3 est

principalement exprimé au niveau des cellules endothéliales lymphatiques. Le VEGF-C peut induire la formation d'hétérodimères VEGFR-2/VEGFR-3 sur les cellules endothéliales lymphatiques (Dixelius *et al.*, 2003).

III.2.2. Les neuropilines

Les neuropilines (NRP-1 et NRP-2) sont des glycoprotéines transmembranaires qui jouent un rôle clef dans le développement des systèmes neuronaux et vasculaires. Les neuropilines (NRPs) sont des récepteurs de la famille des sémaphorines de classe 3, facteurs de la guidance axonal et des récepteurs de la famille du VEGF, facteurs de l'angiogenèse.

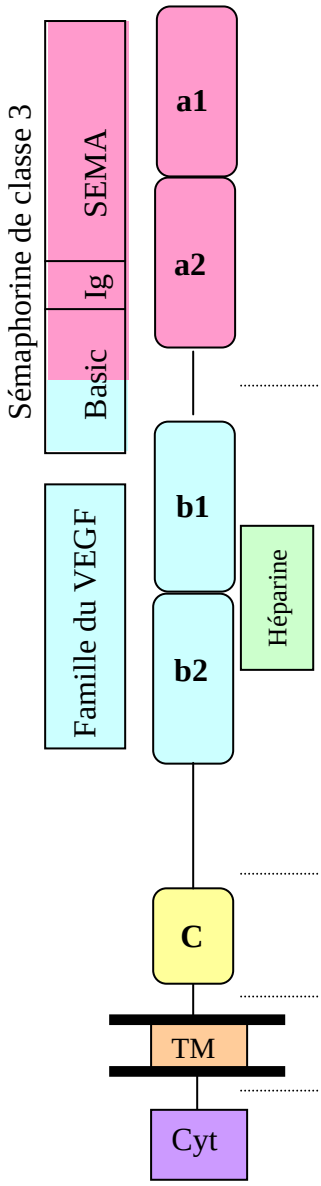
La neuropiline a été observée pour la première fois sur certains axones au cours du développement embryonnaire du Xénope « *Xenopus* » à l'aide d'anticorps dirigés contre un antigène spécifique des neurones « A5 » (Takagi *et al.*, 1991). En 1997, deux équipes rapportèrent qu'il s'agissait d'un récepteur de SEMA3A, une des sémaphorines (SEMA) de classe 3 (He et Tessier-Lavigne, 1997 ; Kolodkin *et al.*, 1997). Un homologue de la neuropiline ayant plus tard été identifié et nommé neuropiline-2 (NRP-2), la neuropiline fut renommée neuropiline-1 (NRP-1). Au départ, la neuropiline a été décrite comme un médiateur de la guidance axonale mais il a été démontré, par la suite, que ces récepteurs sont également impliqués dans le développement des vaisseaux sanguins, dans l'angiogenèse tumorale et la progression tumorale en agissant comme récepteur du $VEGF_{165}$ (Ellis, 2006).

III.2.2.1. Structure et signalisation des neuropilines

- ***Formes solubles et transmembranaires***

Les NRPs sont des récepteurs de 130 à 140 kDa non à activité tyrosine kinase (Soker *et al.*, 1998) composés d'un domaine extracellulaire de 840 résidus d'acides aminés, d'un domaine transmembranaire de 25 résidus d'acides aminés et d'un domaine cytoplasmique de 40 résidus d'acides aminés. Le domaine extracellulaire est composé (i) d'un domaine A composé de deux domaines a1a2 homologues des protéines du complément C1r et C1s ; (ii) d'un domaine B composé de deux domaines b1b2 homologues des facteurs de coagulation V/VII ; (iii) d'un domaine C implique dans l'oligomérisation de NRP (Geretti *et al.*, 2008).

Tableau 7 : Schéma de la stucture et des fonctions des neuropilines.



Domaine NRP		Fonction	Réference
A	**a1-NRP1**	Liaison SEMA3A	Gu *et al.*, 2002
	a2-NRP1	Liaison SEMA3A	Gu *et al.*, 2002
	a1a2-NRP1/2	Liaison SEMA3A/F	Nakamura *et al.*, 1998 ; Geretti *et al.*, 2007
		Augmente la liaison du $VEGF_{165}$ au domaine b de NRP-1	Mamluk *et al.*, 2002
B	**b1-NRP1**	Liaison SEMA3A	Gu *et al.*, 2002
		Liaison $VEGF_{165}$	Gu *et al.*, 2002 ; Vander Kooi *et al.*, 2007
		Liaison héparine	Vander Kooi *et al.*, 2007
	b2-NRP1	Liaison héparine	Vander Kooi *et al.*, 2007
	b1-NRP2	Liaison $VEGF_{165}$	Geretti *et al.*, 2008
	b1b2-NRP1/2	Liaison SEMA3A/F	Nakamura *et al.*, 1998 ; Geretti *et al.*, 2007
		Liaison $VEGF_{165}$, PIGF-2, VEGF-C	Gluzman-Poltorak *et al.*, 2000 ; Mamluk *et al.*, 2002 ; Karpanen *et al.*, 2006 ; Geretti *et al.*, 2007
		Liaison héparine	Mamluk *et al.*, 2002
C		Dimérisation de NRP	Takagi *et al.*, 1991 ; Giger *et al.*, 1998 ; Nakamura *et al.*, 1998 ; Renzi *et al.*, 1999 ; Nakamura et Goshima, 2002
Transmembranaire (NRP-1) GVLLGAVCG		Dimérisation de NRP-1	Roth *et al.*, 2008
Cytoplasmique		Intéraction avec NIP ; essentielle pour la migration des CE dépendante de NRP1	Wang *et al.*, 2003

D'après Geretti *et al.*, 2008

De récents travaux ont montré que NRP-1 possède un domaine transmembranaire (GVLLGAVCG) nécessaire à la dimérisation du récepteur et requis pour la signalisation de la SEMA3A (Roth *et al.*, 2008) (Tableau 7). Les NRP-1 et -2 ne possèdent que 45% d'homologie au niveau de leur séquence en acides aminés (Neufeld *et al.*, 2002).

La NRP-1 ne possède qu'une seule forme transmembranaire, tandis que plusieurs isoformes transmembranaires de NRP-2 ont été décrites, issues de l'épissage alternatif. Les formes humaines de NRP sont NRP-1, NRP-2a et NRP2b. Ces isoformes ont des expressions

tissu-spécifiques. Ainsi, NRP2a est abondante dans le plasma, le foie et les poumons, et elle est peu exprimée dans les muscles squelettiques alors que pour NRP2b, c'est l'inverse (Rossignol *et al.*, 2000).

Les NRPs possèdent également des formes solubles (sNRPs) composées des domaines A et B extracellulaires. A ce jour, quatre formes de sNRP1 (s_{12}NRP1, s_{11}NRP1, s_{III}NRP1 et s_{IV}NRP1) et une forme sNRP2 (s_9NRP2) ont été décrites dans la littérature (Gagnon *et al.*, 2000 ; Rossignol *et al.*, 2000 ; Cackowski *et al.*, 2004).

- ***Ligands des neuropilines***

Les NRPs agissent comme des récepteurs ou des co-récepteurs pour deux classes de ligands : les SEMA3 et certains sous-types de la famille du VEGF.

Les ligands de la NRP-1 sont le $VEGF_{121}$, $VEGF_{165}$, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, PlGF-2, HGF, SEMA3A, SEMA3B et SEMA3C. Les ligands de la NRP-2 sont le $VEGF_{165}$, $VEGF_{145}$, VEGF-C, VEGF-D, HGF, SEMA3B, SEMA3C et SEMA3F (Geretti *et al.*, 2008).

Les domaines de liaison des NRPs pour les SEMAs et le $VEGF_{165}$ sont les domaines extracellulaires A et B. Le domaine B des NRPs est nécessaire et suffisant pour la liaison du VEGF165, PlGF-2 et VEGF-C (Tableau 7). Cependant, pour NRP-1, la présence du domaine A augmente considérablement la liaison du $VEGF_{165}$. L'interaction du $VEGF_{165}$ et du PlGF-2 avec NRP1 est significativement augmentée en présence d'héparine (Mamluk *et al.*, 2002). De plus, l'exon 7 du VEGF est indispensable à sa liaison aux neuropilines (Soker *et al.*, 1997). NRP-1 et NRP-2 possèdent deux régions b1-NRP présentant de fortes homologies de séquences pour plusieurs espèces. L'une de ces régions correspond au site de liaison de l'exon 8 du VEGF et l'autre pourrait être responsable de l'interaction avec l'exon 7 (Appleton *et al.*, 2007).

- ***Signalisation des neuropilines***

NRP-1 agit comme un co-récepteur du VEGFR-2 dans les cellules endothéliales (Soker *et al.*, 1998). Le rôle des NRPs n'est pas encore totalement défini dans les cellules tumorales. Dans des cellules de carcinome mammaire, le $VEGF_{165}$ agit comme un facteur de survie cellulaire autocrine par l'activation d'une voie de survie de Akt dépendante de NRP-1 (Bachelder *et al.*, 2001).

Les résidus d'acides aminés en C-terminal du récepteur (SEA) sont essentiels à la migration des cellules endothéliales dépendantes de NRP-1 (Wang *et al.*, 2003). Ces résidus

d'acides aminés interagissent directement avec le domaine PDZ (PSD-95/Dlg/ZO-1) de la protéine NIP (*NRP-interacting protein*). Le domaine PDZ permet l'établissement d'interactions entre le domaine cytoplasmique de NRP et des molécules de signalisation intracellulaires (Cai et Reed, 1999 ; Prahst *et al.*, 2008). Ce domaine PDZ se retrouve également dans les protéines GIPC (*RGS-GAIP-interacting protein C terminus*) et SEMCAP-1 (*M-SemaF cytoplasmic domain-associated protein-1*) (Nakamura et Goshima, 2002).

III.2.2.2. Interaction avec le VEGFR-2

La signalisation médiée par le $VEGF_{165}$ *via* la NRP-1 se ferait par la formation de complexes avec le VEGFR-2 (Soker *et al.*, 1998 ; Gluzman-Poltorak *et al.*, 2000). Contrairement à l'isoforme $VEGF_{121}$, l'isoforme $VEGF_{165}$ se lie à la NRP-1, du fait de la présence d'un domaine encodé par l'exon 7 (Soker *et al.*, 1996 ; Soker *et al.*, 1997). Le $VEGF_{165}$ se lie par ailleurs au VEGFR-2, *via* une région codée par l'exon 4, ce qui conduit à la formation d'un complexe ternaire entre le $VEGF_{165}$, NRP-1 et VEGFR-2 (Figure 12 p.46) (Gu *et al.*, 2002 ; Soker *et al.*, 2002). Le $VEGF_{121}$, qui ne possède pas l'exon 7, peut se fixer à NRP-1 mais ne permet pas la formation du complexe ternaire (Pan *et al.*, 2007 ; Shraga-Heled *et al.*, 2007).

III.2.2.3. Les neuropilines dans le développement vasculaire

Bien que les neuropilines aient été tout d'abord décrites comme des récepteurs des sémaphorines dans le guidage axonal, il a été démontré que les NRPs jouaient également un rôle dans l'activité des cellules vasculaires.

Les NRPs sont des récepteurs de facteurs angiogéniques qui sont exprimées dans le système vasculaire. Dans le développement du système vasculaire de la souris, NRP-1 est exprimée préférentiellement par les artères et NRP-2 par les veines et les vaisseaux lymphatiques (Herzog *et al.*, 2001). Les NRPs sont également présentes dans les vaisseaux matures et en développement, à la fois sur les CML (Stephenson *et al.*, 2002) et sur les cellules endothéliales (CE).

Chez l'embryon, la NPR-1 est exprimée dans le système nerveux, le cœur et les vaisseaux (Kawasaki *et al.*, 1999). Chez l'adulte, son expression a été retrouvée principalement dans le coeur, le placenta et les vaisseaux sanguins. La NRP-2 est exprimée principalement dans le système nerveux au cours du développement. Certaines isoformes sont exprimées dans le tissu nerveux adulte. Contrairement à la NRP-1, elle n'est pas exprimée dans le coeur et les vaisseaux sanguins sauf dans l'aorte dorsale (Chen *et al.*, 1997).

III.2.2.4. Les neuropilines et l'angiogenèse tumorale

Des études ont montré que l'expression de la NRP-1 au niveau des cellules cancéreuses favorisait l'angiogenèse tumorale (Gagnon *et al.*, 2000 ; Parikh *et al.*, 2004).

La présence de la NRP-1 augmente la liaison du $VEGF_{165}$ à VEGFR-2 (Soker *et al.*, 2002), et potentialise les effets mitogéniques et chimiotactiques médiés par le VEGFR-2 (Soker *et al.*, 1998 ; Bernatchez *et al.*, 2002 ; Rollin *et al.*, 2004).

III.2.2.5. Une signalisation propre

Plusieurs études suggèrent que la signalisation médiée par le VEGF *via* les NRPs peut se faire en l'absence de VEGFR-1 ou de VEGFR-2 (Soker *et al.*, 1996 ; Soker *et al.*, 1998 ; Wang *et al.*, 2003 ; Murga *et al.*, 2005). Ainsi, le $VEGF_{165}$ inhibe l'apoptose dans la lignée de cancer du sein humain MDA-MB-231, qui exprime NRP-1 mais pas VEGFR-2 (Bachelder *et al.*, 2001). Wang *et al.* ont, quant à eux, utilisé une protéine de fusion comportant la portion extracellulaire du récepteur à l'EGF et les portions transmembranaire et intracellulaire de la NRP-1, et transfecté ce co-récepteur dans des HUVEC (*Human umbilical vein endothelial cell*), qui ne possèdent pas naturellement de récepteur à l'EGF (Wang *et al.*, 2003). L'ajout d'EGF à ces cellules induit une signalisation intracellulaire, démontrant que la signalisation *via* les NRPs peut se faire indépendamment de l'association avec les VEGFRs.

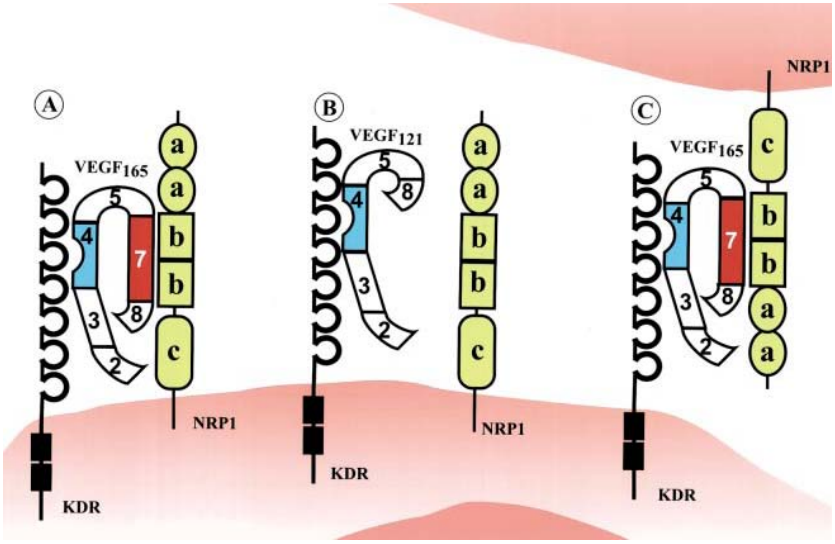


Figure 12 : Interactions de la NRP-1 avec VEGFR-2/KDR.

A : L'isoforme $VEGF_{165}$ se lie à la NRP-1, du fait de la présence d'un domaine encodé par l'exon 7 et au VEGFR-2/KDR, *via* une région codée par l'exon 4, ce qui conduit à la formation d'un complexe ternaire entre le $VEGF_{165}$, NRP-1 et VEGFR-2. *B :* L'isoforme $VEGF_{121}$, ne possédant pas l'exon 7, ne permet pas la formation du complexe. C : Des complexes juxtacrines peuvent également se créer entre NRP-1 et VEGFR-2/KDR situés sur deux cellules différentes, par exemple des cellules tumorales et des cellules endothéliales. D'après Soker *et al.*, 2002.

IV. Ciblage des photosensibilisateurs

Les photosensibilisateurs de troisième génération sont des PSs modifiés, conjugués ou vectorisés. L'objectif est d'améliorer leur sélectivité vis-à-vis du tissu cancéreux par comparaison au tissu sain. La Figure 13 illustre schématiquement les différentes approches de ciblage des cellules néoplasiques (Rosenkranz *et al.*, 2000 ; Konan *et al.*, 2002 ; Sharman *et al.*, 2004).

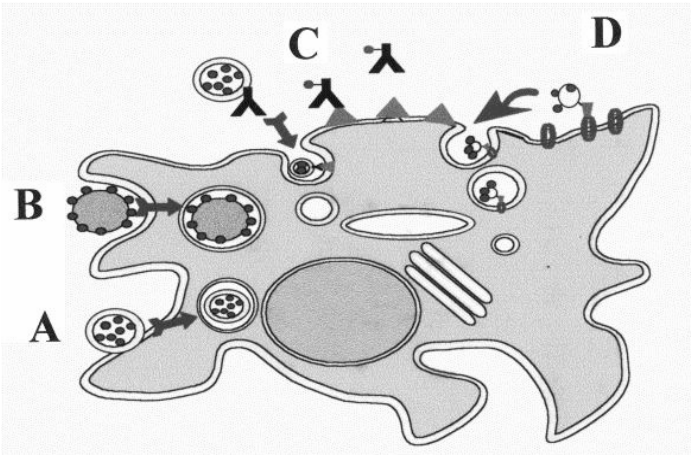


Figure 13 : Stratégies générales de ciblage des photosensibilisateurs vis-à-vis des cellules néoplasiques.

Ciblage passif : véhiculés par les liposomes (A), délivrées par des microsphères ou nanoparticules (B). Ciblage actif : liposomes conjugués à des anticorps (C), adressage par conjugaison entre un ligand spécifique de récepteurs membranaires surexprimés. D'après Sobolev *et al.*, 2000.

IV.1 Ciblage passif

IV.1.1. Ciblage des cellules tumorales

Le ciblage passif des cellules tumorales en PDT consiste à vectoriser les PSs grâce à différents systèmes de formulation facilitant leur transport et leur incorporation dans les cellules cancéreuses. Plusieurs types de vecteurs peuvent être utilisés : les liposomes, les nanoparticules et les systèmes micellaires. Ces stratégies peuvent également être utilisées dans le cadre de ciblage actif vasculaire ou de cellules tumorales. Dans ces cas, les vecteurs sont associés à un système adresseur. Ces différentes formulations sont présentées Figure 14.

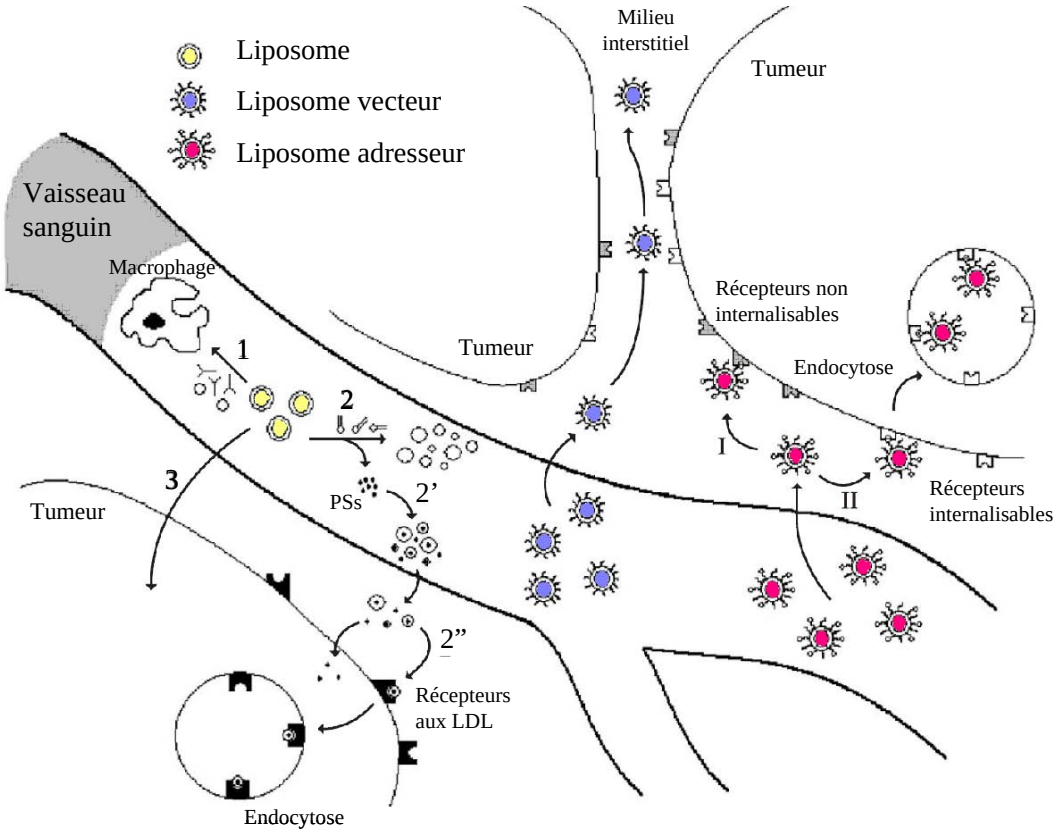


Figure 14 : Comportement *in vivo* de différents types de systèmes vecteurs des PSs

Les **liposomes** (en jaune) ont une durée de vie plasmatique courte du fait de leur prise en charge par les macrophages (1) ou en raison de leur interaction avec les lipoprotéines plasmatiques, suivie par la désintégration des liposomes et la libération des PSs (2). Les PSs peuvent ensuite s'associer avec les protéines plasmatiques (2') et entrer dans la tumeur par endocytose *via* les récepteurs aux LDL (2''). Une petite fraction des liposomes conventionnels atteint la tumeur dans sa formulation originale et permet l'absorption intracellulaire des PSs directement par leur liaison aux protéines de surface (3). Les **particules de polymère** (en violet) s'accumulent dans le milieu interstitiel des tumeurs sans incorporation intracellulaire. Les **systèmes adresseurs** (en rose) peuvent se fixer à la surface des tumeurs sans internalisation (I) ou entrer dans la tumeur par endocytose *via* des récepteurs spécifiques internalisables (II). D'après Derycke et de Witte, 2004.

IV.1.1.1. Liposomes

Les liposomes représentent d'intéressants vecteurs de PSs en PDT du fait de leur nature amphiphile et de leur compatibilité avec les systèmes biologiques. Ce sont des vésicules unilamellaires ou multilamellaires composées de phospholipides et de cholestérol pouvant incorporer des PSs aussi bien lipophiles qu'hydrophiles. Le cholestérol apporte la rigidité à la bicouche membranaire en réduisant la perméabilité des molécules encapsulées et en augmentant la stabilité de la bicouche en présence des fluides. L'encapsulation des PSs dans des vésicules liposomales permet d'augmenter leur perméabilité et leur rétention. Les PSs s'accumulent passivement dans les tumeurs à des concentrations élevées en comparaison aux tissus sains (Vemuri et Rhodes, 1995).

L'Hématoporphyrine (Hp) a été encapsulée dans un liposome unilamellaire composé de dipalmitoylphosphatidyl-choline (DPPC). Le profil pharmacocinétique a été comparé à la forme dissoute dans un tampon salin phosphate (PBS). L'étude *in vivo* réalisée chez la souris sur un modèle de fibrosarcome (MS-2) a montré une meilleure incorporation tumorale pour la forme liposomale (Jori *et al.*, 1986). La forme liposomale du dérivé de benzoporphyrine mono acide cycle A (BPD-MA) s'incorpore dans les tissus tumoraux plus rapidement (demi-vie de 16,1 h *versus* 16,9 h) et à plus forte concentration (ratio tumeur/muscle 19,2 *versus* 12,6) que sa forme non liposomale (Richter *et al.*, 1993). Le Photofrin® sous une forme liposomale présente une meilleure incorporation tumorale (8,6 *versus* 3,6 $\mu g.g^{-1}$ dans la tumeur) et s'est révélé plus efficace (18 % de tissus nécrotique *versus* quelques cellules nécrotiques après PDT) pour un gliome malin humain, en comparaison à la forme non liposomale (Jiang *et al.*, 1998). La bactériochlorine-a (BCA) a été vectorisée dans le liposome DMPC (dimyristoyl phosphatidylcholine). Des travaux ont montré que la forme liposomale présente une meilleure efficacité photodynamique, la consommation en oxygène est neuf fois plus élevée et l'efficacité de la PDT augmentée jusqu'à 5 fois, pour un modèle de cellules cancéreuses de colon humain (WiDr). Ces résultats peuvent être expliqués par l'augmentation de l'incorporation intracellulaire du PS et par une diminution du phénomène d'agrégation des PSs (Damoiseau *et al.*, 2001). Le Foslip® est une forme liposomale (DPPC) de la *m*-THPC facilitant son administration par voie intra-veineuse. Une étude récente a montré une différence de temps de vie de fluorescence entre le Foscan® et le Foslip® (6,6 *versus* 8,4 ns) traduisant une différence de localisation cellulaire (Lassalle *et al.*, 2008).

De nombreux autres systèmes liposomaux ont été étudiés en PDT. En règle générale, ils permettent d'améliorer l'incorporation cellulaire et de diminuer les phénomènes d'agrégation (Konan *et al.*, 2002 ; Derycke et de Witte, 2004 ; Zimcik *et al.*, 2007). Les liposomes peuvent être également utilisés, conjugués à des molécules se fixant spécifiquement aux cellules tumorales, pour des stratégies de ciblage actif.

Ces systèmes liposomaux présentent néanmoins des inconvénients. En effet, les liposomes peuvent se fixer aux lipoprotéines de haut poids moléculaire (HDL), ce qui provoque leur désintégration. Le PS se retrouve ainsi dans la circulation sanguine où il se fixe aux lipoprotéines plasmatiques et intègre les cellules *via* les récepteurs aux LDL. Les liposomes peuvent également être rapidement pris en charge par les macrophages (Figure 14). Ainsi, ces liposomes possèdent des demi-vies plasmatiques faibles rendant leur action en tant que vecteur de courte durée.

IV.1.1.2. Nanoparticules

Les nanoparticules peuvent être biodégradables ou non. Des revues récentes décrivent les différents types de nanoparticules étudiées pour des applications en PDT (Bechet *et al.*, 2008 ; Chatterjee *et al.*, 2008a).

Les **nanoparticules biodégradables** sont des systèmes permettant, entre autre, de contrôler la libération des PSs (Konan *et al.*, 2002). Ce sont des transporteurs de PSs très prometteurs pour des applications en PDT. L'utilisation de ces nanoparticules permet de protéger les PSs contre les enzymes et peut leur permettre d'être non-immunogènes. Leur faible taille permet aux PSs de pénétrer les tissus à travers les capillaires sanguins fenestrés, facilitant ainsi l'incorporation tumorale. De plus, pour les formes non biodégradables, la taille des pores des nanoparticules peut être contrôlée. De même que pour les liposomes, ces particules peuvent être conjuguées à des molécules d'adressage pour des stratégies de ciblage actif.

Dans le but de réduire l'agrégation des bactériochlorophyles (BChl) en solution aqueuse, des nanoparticules de copolymères de lactide et glycolide *(poly(DL-lactide-co-glycolide)*, PLGA) chargées avec de la BChl-a ont été testées sur des macrophages. La majorité des nanoparticules sont phagocytées 2 h après incubation par ces cellules. Le processus de relarguage a lieu en deux étapes : l'adhérence des particules à la surface de la cellule suivie par la libération du PS conduisant à des photodommages de la surface cellulaire après PDT (Gomes *et al.*, 2005 ; Gomes *et al.*, 2007). Des résultats similaires ont été obtenus avec des nanoparticules de PLGA contenant de la méso-tétra (*p*-hydroxy-phényl) porphyrine (*p*-THPP) incubées en présence de cellules cancéreuses mammaires de souris (EMT-6) (Konan *et al.*, 2003). Deux autres PSs, la *méso*-tétraphénylporphyrine (*m*-TPP) et le *méso*-tétra-phénylporpholactol (*m*-TPPPL) ont été encapsulés dans des nanoparticules de PLGA. Une comparaison de la photocytotoxicité entre les nanoparticules internalisées ou non a démontré que 95% des photodommages, pour un modèle *in vivo* de cancer de la prostate, ont été causés par les nanoparticules internalisées (McCarthy *et al.*, 2005). L'Hypéricine (Hy) a également été encapsulée dans des nanoparticules de polymère de lactide (*poly(DL-lactide)*, PLA) présentant une nette amélioration de la phototoxicité par comparaison au PS libre (Zeisser-Labouebe *et al.*, 2006).

Par rapport aux polymères biodégradables, les **nanoparticules non biodégradables** présentent plusieurs avantages. En effet, elles sont très stables à des fluctuations de température et de pH (Jain, 2005). La taille, la forme, la porosité et la mono-dispersion peuvent être facilement contrôlées au cours de leur préparation (Wang *et al.*, 2004). Elles ne

sont pas soumises aux attaques microbiennes (Weetall, 1970). De plus, les particules de céramique possèdent de minuscules pores (0,50 à 1,00 nm de diamètre), trop petits pour permettre aux drogues de s'échapper de la matrice, mais suffisamment efficaces pour permettre la diffusion de l'oxygène dans et en dehors de la particule (Brown, 2003).

A titre d'exemple, le bleu de méthylène encapsulé dans une nanoparticule de polyacrylamide ORMOSIL (*organically modified silica*) s'est révélé significativement phototoxique sur une lignée cellulaire de gliome de rat (Tang *et al.*, 2005). Le PS HPPH (2-devinyle-2-(1-hexyloxyéthyl)pyrophéophorbide) a été encapsulé dans une nanoparticule de céramique. L'étude *in vitro* a montré des taux de mort cellulaire significatifs sur un modèle de carcinome ovarien humain (Roy *et al.*, 2003). La *m*-THPC a également été encapsulée dans une nanoparticule ORMOSIL. Les travaux ont révélés que la forme encapsulée permettait une meilleure production d'oxygène singulet (Yan et Kopelman, 2003).

IV.1.1.3. Emulsions et micelles

Les émulsions et les micelles améliorent la solubilité des PSs, leur dispersion et leur internalisation cellulaire (Garbo *et al.*, 1998 ; Jones et Leroux, 1999).

L'huile de dispersion la plus utilisée pour réaliser des émulsions de PSs est le Cremophor® (CMR) (Konan *et al.*, 2002). Bien que cette huile soit un transporteur efficace elle peut aussi provoquer des réactions anaphilactiques (Dorr, 1994).

Deux formulations du PS $SnET_2$ (Tin étiopurpurine) ont été comparées : une émulsion de CMR et une forme liposomale de DPPC. Sur un modèle de cancer de vessie chez le rat, l'émulsion s'est révélée plus phototoxique que la forme liposomale (Morgan *et al.*, 1988). Une phthalocyanine, notée SiPc (bis(méthyl-oxyéthylèneoxy)silicon-phthalocyanine), a également été testée, transportée dans ces deux formulations. Le PS a été testé sur un carcinome de poumon chez la souris. L'émulsion a permis une incorporation dans la tumeur à des taux deux fois plus importants que la forme liposomale (Wohrle *et al.*, 1999).

Des études ont montré que des micelles polymériques peuvent être une bonne alternative aux formulations de CRM pour le transport de PS. La phthalocyanine d'aluminium chlorée (AlCIPc) sous forme micellaire présente par exemple, une meilleure phototoxicité *in vitro* (EMT-6) que sous forme d'émulsion. *In vivo*, la forme micellaire permet d'éviter les réactions secondaires (Le Garrec *et al.*, 2002).

IV.1.2. Ciblage vasculaire

Le ciblage vasculaire passif en PDT est basé sur l'accumulation du PS dans le compartiment vasculaire. Trois paramètres peuvent être mis en jeu pour améliorer cette accumulation : les propriétés physicochimiques du PS, l'intervalle drogue-lumière et l'irradiance.

Les **propriétés physicochimiques** des PSs peuvent contribuer à l'effet vasculaire passif. Ainsi, la plupart des PSs sont hydrophobes et s'associent aux protéines plasmatiques (Sharman *et al.*, 2004). Les PSs fixés aux LDL peuvent s'accumuler préférentiellement dans les cellules endothéliales en prolifération grâce à la voie d'endocytose des récepteurs aux LDL (Schmidt-Erfurth et Hasan, 2000).

La **diminution de l'IDL** favoriserait l'effet vasculaire de la PDT. En effet, suite à l'injection par voie intra-veineuse (i.v.) du PS, celui-ci se localise initialement au niveau du compartiment vasculaire (plasma, puis endothélium) et peut ensuite diffuser dans les cellules tumorales (Chen *et al.*, 2006). Par conséquent, une irradiation à un IDL court aura tendance à favoriser l'effet anti-vasculaire de la PDT. L'IDL favorisant l'effet anti-vasculaire peut varier de quelques minutes à quelques heures en fonction des propriétés pharmacocinétiques du PS.

L'hypéricine présente une action anti-vasculaire importante 30 min après son injection, au moment où sa concentration est maximale dans les vaisseaux de tumeurs RIF-1 induites chez la souris. Cet effet anti-vasculaire est fortement atténué lorsque le PS se localise de manière diffuse dans les cellules tumorales, 6 heures après son injection (Chen *et al.*, 2002a ; Chen *et al.*, 2002b).

Chez des rats porteurs de chondrosarcome, traités avec de la verteporfin® (BPD-MA, 2 mg/kg, i.v.) et irradiés à 690 nm avec une fluence à 150 J/cm^2, une stase vasculaire au niveau des vaisseaux tumoraux a été observée par microscopie intravitale pour des IDL courts (entre 5 et 30 min), alors que ces modifications vasculaires n'ont pas été observées pour un IDL plus long, de 180 min (Fingar *et al.*, 1999). Des études sur un modèle de sac à air dorsal chez la souris avec la Verteporfin® sous sa forme liposomale ont également montré un fort effet anti-vasculaire avec un IDL court (15 min), comparé à un IDL de 3 h (Kurohane *et al.*, 2001).

De nombreuses études faites sur différents modèles de tumeur démontrent que le taux de PS dans le plasma est un meilleur facteur prédictif pour la réponse tumorale que la concentration tumorale en PS. Ainsi les traitements utilisant des IDL plus courts (lorsque le

PS est présent en grande quantité dans le plasma) s'avèrent être plus efficaces (Veenhuizen *et al.*, 1997a ; Veenhuizen *et al.*, 1997b ; Cramers *et al.*, 2003 ; Triesscheijn *et al.*, 2005).

Un des PSs les plus performants actuellement dans cette stratégie de ciblage vasculaire passif est le palladium-bactériophéophorbide (WST09, Tookad®). La durée de demi-vie plasmatique du Tookad® est d'environ 20 min (Weersink *et al.*, 2005b). Avec sa clairance plasmatique très rapide, il est nécessaire d'irradier très rapidement après administration pour induire une réponse vasculaire optimale (Chen *et al.*, 2002c ; Koudinova *et al.*, 2003 ; Weersink *et al.*, 2005a ; Woodhams *et al.*, 2006). Le Tookad® induit des dommages vasculaires intenses avec des IDL de l'ordre de 5 à 10 min, sur différents modèles animaux (Borle *et al.*, 2003 ; Tremblay *et al.*, 2003), et ces dommages sont réduits par l'application d'IDL plus longs (Borle *et al.*, 2003). Le Tookad® est actuellement en essais cliniques de phase II pour le cancer de la prostate.

Le **choix de l'irradiance** (reflétant la vitesse à laquelle la lumière est appliquée) semble également être un paramètre important pour l'observation d'un effet anti-vasculaire, mais son rôle est moins clair que celui de l'IDL. Chez des animaux traités par PDT avec du Photofrin® (25 mg/kg), et un IDL de 24 heures, il a été détecté une modification du diamètre de la lumière des artérioles et des veinules à une irradiance de 75 mW/cm^2, et non à 50 mW/cm^2 (Fingar *et al.*, 2000). Une étude similaire a été réalisée sur des muscles de rats sains sensibilisés avec de l'acide amino-lévulinique (200 mg/kg), irradiés à 105, 178 ou 300 mW/cm^2 (Leveckis *et al.*, 1995). Une diminution du diamètre des veinules et des artères a été mise en évidence immédiatement après initiation du traitement administré aux deux plus fortes irradiances. Les auteurs ont montré que l'intensité de la vasoconstriction ainsi que l'incapacité des vaisseaux à récupérer étaient proportionnelles à l'irradiance appliquée. Ces résultats suggèrent que l'application d'une forte irradiance favorise l'effet anti-vasculaire de la PDT. Cependant, d'autres études montrent une corrélation inverse, où de faibles irradiances induisent de plus importants dommages vasculaires (Dougherty *et al.*, 1998).

IV.2 Ciblage actif

Idéalement, un système possédant un PS, pour être sélectif et efficace devrait posséder, outre le PS (Figure 15) :

- un ligand internalisable conférant une spécificité de délivrance de la molécule dans la cellule cancéreuse ;
- une séquence avec une activité endosomolytique, permettant à la molécule d'être libérée dans le cytoplasme ;
- un signal pour un ciblage cellulaire (peptide de localisation nucléaire noté NLS, *nuclear localization signal*).

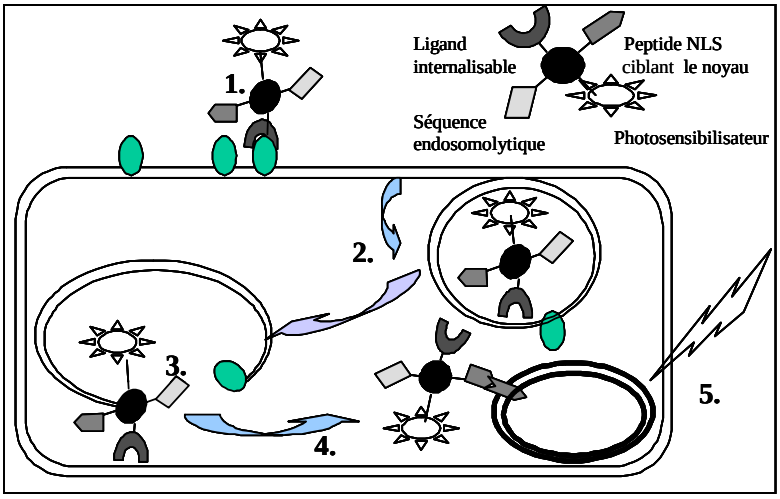


Figure 15 : Devenir d'un système PS possédant différents modules

1. Reconnaissance du récepteur de la cellule cible. 2. Pénétration par endocytose (pinocytose ou potocytose) à l'intérieur de la cellule cible. 3. Libération du PS de l'endosome. 4. Transport vers le noyau grâce au peptide signal de localisation nucléaire (NLS). 5. Photoirradiation induisant la destruction de la cellule cancéreuse (d'après Sobolev et *al.*, 2000).

IV.2.1. Ciblage des cellules tumorales

Le ciblage actif des cellules tumorales en PDT consiste à modifier les PSs ou les systèmes vecteur-PSs en les conjuguant à des molécules possédant une forte affinité pour des marqueurs spécifiques des cellules tumorales. L'adressage de PSs permet de limiter leur activité photodynamique aux cellules cancéreuses en modifiant leur pharmacocinétique et leur biodistribution. Ainsi, l'efficacité de la PDT peut être améliorée et la phototoxicité des cellules saines diminuée (Chen *et al.*, 2006).

Les cibles moléculaires utilisées en PDT peuvent être des antigènes ou des récepteurs surexprimés par les cellules.

IV.2.1.1. Antigènes membranaires

Mew *et al.* ont été les premiers à utiliser le terme de photoimmunothérapie pour désigner l'utilisation d'un PS conjugué à un anticorps ciblant spécifiquement le tissu tumoral. L'hématoporphyrine a été directement conjuguée à un anticorps monoclonal dirigé contre un myosarcome M1 de souris (anti-M1). Ces travaux ont montré que le PS conjugué induisait sélectivement l'inhibition de la croissance tumorale (Mew *et al.*, 1983). L'Hp a également été conjuguée à l'anticorps CAMAL (*leukemia-associated antigen*). L'étude a montré que les cellules cancéreuses n'exprimant pas l'antigène spécifique ne répondaient pas à la PDT. En effet, le PS libre n'induisait pas de mort cellulaire même avec des concentrations 100 fois plus élevées que celles permettant au PS conjugué d'être photodynamiquement cytotoxique (Mew *et al.*, 1985).

Le greffage direct d'anticorps monoclonaux aux PSs est facilement réalisable mais peut diminuer l'affinité et la spécificité de l'anticorps vis-à-vis de l'antigène (Chen *et al.*, 2006). L'utilisation de bras espaceurs permet d'augmenter la flexibilité permettant ainsi de réduire l'encombrement stérique. La chlorine e6 a été conjuguée, *via* un composé dextrane, à un anticorps monoclonal (anti Leu-1, L17 F12) dirigé contre les lymphocytes T. Ces travaux ont montré qu'après conjugaison, l'affinité de l'anticorps est préservée à 80% et les caractéristiques photophysiques de la chlorine e6 sont conservées (Oseroff *et al.*, 1986). Un autre PS, le BPD-MA a été conjugué, *via* l'alcool polyvinylique (PVA), à l'anticorps Mab 5E8 ciblant un antigène exprimé par un carcinome pulmonaire humain. Cette étude menée *in vitro* sur des cellules A549 a montré que le conjugué présentait des meilleures sélectivité et activité photodynamique que le PS libre (Jiang *et al.*, 1991).

La chlorine e6 et la chlorine e6 monoéthylène diamine monoacide (CMA) ont toutes deux été conjuguées à deux anticorps. Le premier, l'anticorps OC125 (immunoglobuline IgG1) reconnaît l'antigène CA125 exprimé par 80% des carcinomes ovariens. Le deuxième, l'anticorps monoclonal 17.1A est spécifique des cancers du colon. La CMA a notamment été couplée à l'anticorps OC125 *via* l'acide polyglutamique. Les tests ELISA ont démontré que la liaison antigène-anticorps n'était pas altérée par le greffage. *In vitro*, le conjugué CMA-OC125 est plus cytotoxique pour des cellules cancéreuses ovariennes exprimant l'antigène que la CMA libre (Goff *et al.*, 1991). Une étude *in vivo* chez la souris *nude* a été réalisée avec un modèle d'ascite de cancer ovarien humain induit par une injection intra-péritonéale de

cellules NIH :OVCAR3. L'étude de sélectivité a montré que l'incorporation de CMA-OC125 était plus importante dans les tissus cancéreux que dans les tissus sains (Goff *et al.*, 1994).

La conjugaison d'un anticorps à un PS peut, en raison de la taille importante de l'anticorps, engendrer des problèmes de diffusion et d'élimination du PS conjugué. De ce fait, la fixation du seul fragment $F(ab')_2$ plutôt que l'anticorps en entier peut faciliter la diffusion des conjugués permettant également de diminuer les risques de réaction immunitaire. La conjugaison de la chlorine e6 *via* une poly-*L*-Lysine au fragment $F(ab')_2$ de l'anticorps OC125 a permis d'augmenter son incorporation cellulaire pour un modèle de cancer ovarien d'un facteur 17 (Hamblin *et al.*, 1996).

IV.2.1.2. Récepteurs de facteurs de croissance

Une des caractéristiques des cancers est la croissance incontrôlée des cellules qui peut être expliquée par la surexpression de récepteurs à certains facteurs de croissance (Hanahan et Weinberg, 2000).

L'EGF (*epidermal growth factor*) fait partie d'une famille de facteurs de croissance impliqués dans le développement et le fonctionnement normal de différents organes. L'action de ces facteurs est médiée par une famille de quatre récepteurs trans-membranaires ubiquitaires : EGFR (ErbB1, HER1), ErbB2 (HER2), ErbB3 (HER3) et ErbB4 (HER4). Ce sont des récepteurs à activité tyrosine kinase (appelés RTK) qui sont surexprimés dans de nombreux types de cancers. Ainsi, les récepteurs à l'EGF (EGFR) sont les plus étudiés et les plus utilisés comme cible pour l'adressage de molécules anticancéreuses.

Un anticorps anti-EGFR (C225) a été couplé à la chlorine e6 pour cibler des cellules tumorales surexprimant l'EGFR. L'étude a été réalisée chez le hamster sur un modèle de carcinome de joue. Ces travaux ont montré que cette stratégie permettait de diagnostiquer la zone tumorale et d'améliorer la réponse à la PDT des cellules surexprimant l'EGFR (Soukos *et al.*, 2001). La benzoporphryrine dérivée (BPD) a également été conjuguée à l'anticorps C225 montrant que la PDT avec le conjugué induisait une phototoxicité pour des carcinomes épidermoïdes surexprimant l'EGFR (A-431) mais pas pour des cellules EGFR négatives (NR6) (Savellano et Hasan, 2003).

La *m*-THPC a été couplée à deux anticorps, l'un internalisable (anti-EGFR MAb 425) et l'autre non (anti-CD44v6 Mab U36) pour cibler un carcinome spino-cellulaire de la tête et du cou. Le conjugué possédant l'anticorps internalisable était le plus photocytotoxique (Vrouenraets *et al.*, 1999 ; Soukos *et al.*, 2001 ; Savellano et Hasan, 2003). Des résultats similaires ont également été décrits dans une étude comparant la conjugaison d'un

isothiocyanate de porphyrine avec un anticorps internalisable anti-HER2 et un anticorps non internalisable spécifique de l'antigène carcino-embryonnaire (ACE) (Hudson *et al.*, 2005).

La conjugaison d'un PS à plusieurs épitopes de HER2 (conjugué pyrophéophorbide avec HER50 et HER66) est plus efficace que la conjugaison à un seul épitope (Savellano *et al.*, 2005).

IV.2.1.3. Récepteurs aux LDL (*Low Density Lipoprotein)*

Les récepteurs aux LDL sont impliqués dans le transport de molécules physiologiques (*e.g.* cholestérol) et de molécules thérapeutiques leur permettant d'intégrer les cellules par la voie d'endocytose récepteur-dépendante (Chung et Wasan, 2004 ; Wasan *et al.*, 2008). L'apolipoprotéine B-100 (ApoB-100) est un ligand des récepteurs aux LDL responsable de la reconnaissance et de la fixation des LDL à leurs récepteurs (Figure 16). Bien que l'expression de ces récepteurs soit élevée dans les cellules cancéreuses, les récepteurs sont également exprimés dans d'autres types cellulaires (*e.g.* foie et glande surrénale). Cependant, il a été démontré que les récepteurs aux LDL jouent un rôle important dans l'acheminement intracellulaire des PSs hydrophobes (Bonneau *et al.*, 2004).

Ainsi, de nombreuses études consistent à modifier les PSs pour augmenter leur internalisation active *via* ces récepteurs (Konan *et al.*, 2002). Une stratégie simple vise à conjuguer un PS aux LDL. Toutefois, l'incorporation active dépend du PS, de la nature chimique de la conjugaison et du type de cellules ciblé (Chen *et al.*, 2006). Lorsque l'Hp est couplée aux LDL, son incorporation est augmentée d'un facteur 5 dans des cellules surexprimant les récepteurs aux LDL (Hamblin et Newman, 1994b). La chlorine e6 a également été conjuguée aux LDL. L'incorporation du PS conjugué est 4 fois plus importante en comparaison à la forme libre, ce qui a permis d'augmenter la sélectivité et *in fine* l'efficacité de la PDT dans le cas d'un rétinoblastome (Schmidt-Erfurth *et al.*, 1997). Le ZnPc conjugué à une molécule de LDL s'accumule 2 fois plus dans un fibrosarcome (MS-2) chez la souris en comparaison à sa forme liposomale (Reddi *et al.*, 1990).

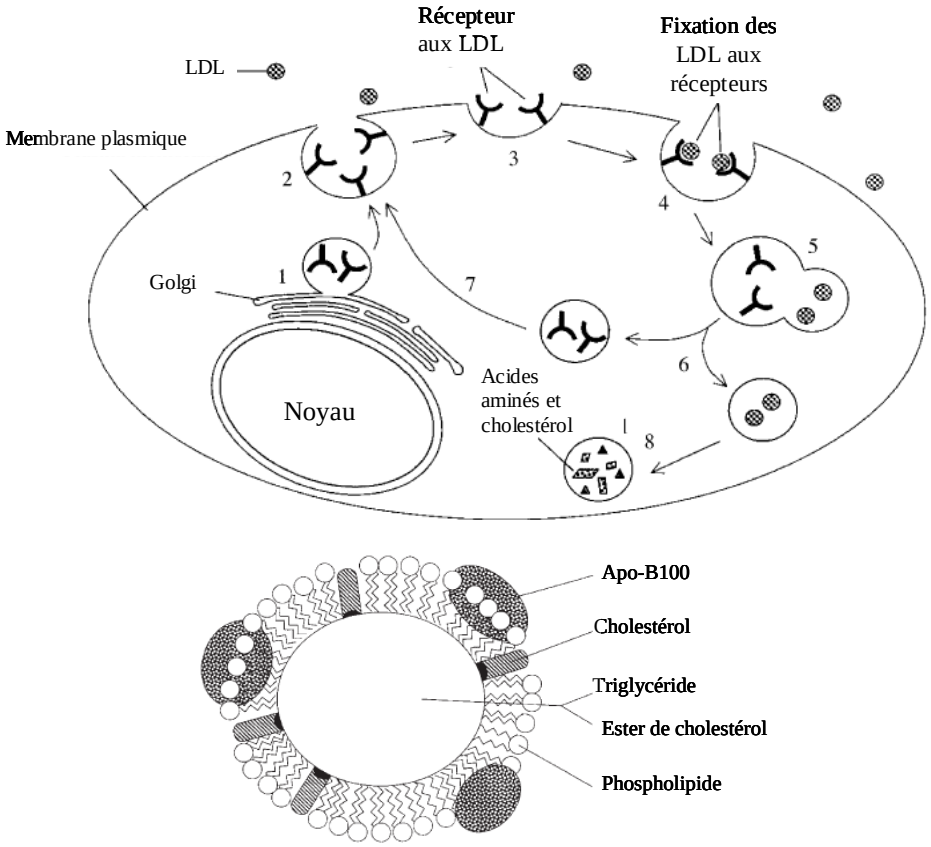


Figure 16 : Signalisation des LDL

Voie des récepteurs aux LDL : Les récepteurs aux LDL sont synthétisés dans l'appareil de Golgi (1) puis sont transportés jusqu'à la membrane cellulaire dans des vésicules (2). Ils sont ensuite exprimés à la surface cellulaire (3) où ils sont reconnus par les molécules de LDL (4). Le complexe LDL-récepteur est internalisé dans des vésicules (5) et les molécules de LDL sont prises en charge par les endosomes (6). Les récepteurs sont recyclés (7). Les LDL sont dégradés en cholestérol et acides aminés (8). **Particule de LDL :** LDL composé de cholesterol, triglycéride et apoprotéine intégrés dans une couche de phospholipides. D'après Chung et Wasan, 2004.

IV.2.1.4. Récepteurs de la transferrine

Les récepteurs de la transferrine, présents à la surface de toutes les cellules de l'organisme, permettent le passage transmembranaire du fer lié à la transferrine. Ce sont des glycoprotéines formées de deux sous-unités identiques, capables de lier une molécule de transferrine. La densité de récepteurs d'une cellule est directement proportionnelle aux besoins en fer de cette cellule. Les cellules à fort indice de prolifération nécessitent un flux continu en fer, d'où la surexpression de ces récepteurs pour certaines cellules tumorales (Ponka et Lok, 1999).

La transferrine a été couplée à l'Hp montrant que l'incorporation par endocytose du conjugué Hp-transferrine dans les cellules NIH-3T-3 et HT29 est récepteur-dépendante. En effet, l'incorporation du conjugué a été partiellement inhibée en présence d'un excès de LDL

et augmentée en présence d'un chélateur de fer (Hamblin et Newman, 1994a). La chlorine e6 a également été couplée à la transferrine. Le conjugué s'est révélé 10 fois plus phototoxique *in vitro* que la chlorine e6 seule pour des cellules d'adénocarcinome mammaire (MCF7 et MTLn3) (Cavanaugh, 2002). Un autre PS hydrophile, la phthalocyanine d'aluminium tétrasulfonée ($AlPcS_4$) a été encapsulée dans un liposome pégylé conjugué à la transferrine. L'étude a montré que le liposome adressé était incorporé par les cellules AY27 en quantité 100 fois plus importante que le liposome sans transferrine (Derycke *et al.*, 2004).

IV.2.1.5. Récepteurs à l'acide folique

L'acide folique (ou vitamine B9) est internalisé sous sa forme oxydée dans la cellule par endocytose ou potocytose *via* un récepteur spécifique envers lequel il présente une très forte affinité, le récepteur à l'acide folique (FR pour *folate receptor*), avant d'être réduit successivement en dihydrofolate par la folate réductase, puis en tétrahydrofolate par la dihydrofolate réductase. Il joue un rôle important dans la réplication de l'ADN (acide désoxyribonucléique) en permettant la transformation de la désoxyuridine monophosphate (dUMP) en désoxythymidine monophosphate (dTMP) et est consommé en grande quantité par les cellules en prolifération.

Il existe trois isoformes du récepteur à l'acide folique (α, β et γ). Ils ont une affinité très forte avec l'acide folique : la constante de dissociation est inférieure à 10^{-9} M (Low *et al.*, 2008). Ces récepteurs sont exprimés uniquement dans certaines cellules épithéliales dans de nombreux types de cancers (Weitman *et al.*, 1992 ; Mantovani *et al.*, 1994 ; Lu et Low, 2002). Ce récepteur se présente comme une cible thérapeutique potentielle en PDT. Notre équipe a démontré, pour la première fois, que la conjugaison d'une porphyrine avec l'acide folique améliorait la sélectivité et l'efficacité photodynamique *in vitro* (Schneider *et al.*, 2005) et *in vivo* (Gravier *et al.*, 2008). *In vitro*, l'étude a été réalisée sur une lignée cellulaire de cancer de l'oropharynx (KB), surexprimant les récepteurs de l'acide folique. Il a été constaté 24 h après l'incubation, que l'incorporation cellulaire des conjugués a été en moyenne 7 fois plus élevée que celle de la tétraphénylporphyrine (TPP) utilisée comme référence. L'incorporation des conjugués a été diminuée de 70% en présence d'acide folique en excès. Des tests de phototoxicité ont démontré que les cellules KB étaient beaucoup plus sensibles à la PDT avec les conjugués. Pour l'étude *in vivo*, des souris *nude* ont été xénogreffées avec ce modèle. Le rapport tumeur/tissu sain en PS est de 5 pour le conjugué et de 2 pour la forme libre 4 h après injection par voie intra-veineuse. Ces résultats prometteurs ont démontré une sélectivité du PS conjugué spécifique des cellules tumorales surexprimant l'isoforme α du récepteur à l'AF.

IV.2.1.6. Transporteurs de glucose et lectines

Les **transporteurs de glucose** (GLUTs) sont des glycoprotéines transmembranaires responsables de l'incorporation du glucose par les cellules. Les cellules cancéreuses, du fait de l'augmentation de leur besoin en énergie, surexpriment généralement les GLUTs. Cette surexpression est en général associée au processus métastasique (Medina et Owen, 2002).

Le pyrophéophorbide a été couplé avec du 2-déoxyglucose (Pyro-2DG). Le pyro-2DG est retenu de façon sélective par des cellules de gliome de rat (9L) et induit une phototoxicité qui provoque des dommages mitochondriaux (Zhang *et al.*, 2003). La tétra(pentafluorophényl)porphyrine a été conjuguée à un dérivé de glucose. L'étude a montré que le conjugué s'incorporait dans les cellules tumorales de façon active *via* les GLUTs. De plus, la phototoxicité pour un modèle cellulaire de cancer du sein humain (MDA-MB-231) est augmentée après conjugaison (Chen *et al.*, 2004b).

Les **lectines** sont des récepteurs membranaires de type glycoprotéines reconnaissant spécifiquement les groupements osidiques. Elles guident les ligands glycosylés vers différents compartiments cellulaires tels que les lysosomes, les endosomes ou l'appareil de Golgi. Certaines cellules cancéreuses possèdent un nombre anormalement élevé de lectines à leur surface (Lotan et Raz, 1988).

Notre équipe a travaillé sur le greffage de groupements glycosylés comme vecteur de porphyrine. L'incorporation d'une porphyrine et d'une chlorine mono-glycosylées ont été respectivement 11,5 et 6,5 fois plus importante que la TPP (Frochot *et al.*, 2003 ; Di Stasio *et al.*, 2005).

Une forte phototoxicité a été observée pour deux porphyrines triglycosylées (galactose et mannose) avec respectivement, des doses létales 50 de 0,05 et 0,35 µM (LD_{50}) pour un modèle cellulaire de rétinoblastome (Laville *et al.*, 2006). Une étude *in vivo* chez le rat a comparé une porphyrine triglycosylée, la 5,10,15-*méso* tri-(*méta*-*O*-β-D-glucosyloxyphényl)-20-phénylporphyrine (*m*-TPP $(Glu)_3$) à la *m*-THPC (Desroches *et al.*, 2006). La *m*-TPP$(glu)_3$ est plus rapidement éliminée de l'organisme que la *m*-THPC avec respectivement des clairances plasmatiques de 19 et 6 $mL.h^{-1}.kg^{-1}$ et des temps de résidence moyen de 5 et 20 h. Récemment, la *m*-TPP$(glu)_3$ a été étudiée dans des cellules tumorales transfectées surexprimant le glycosphingolipide Gb3. Le PS conjugué au sucre s'est révélé beaucoup plus toxique que le PS seul et très sélectif vis-à-vis des cellules surexprimant Gb3 (Amessou *et al.*, 2008).

Ainsi, la synthèse de conjugués portant un ou plusieurs motifs « glucosamine » à caractère hydrophile entraîne plusieurs conséquences en faveur de l'efficacité de la PDT. En effet, la modification de la balance hydrophile-hydrophobe (Sol *et al.*, 2006) influe en particulier sur le taux d'incorporation intracellulaire, les modes d'agrégation, la localisation cellulaire et l'efficacité photodynamique. De plus, les composés possédant un nombre impair de motifs glycosylés sont souvent les plus efficaces (Momenteau *et al.*, 1999 ; Laville *et al.*, 2003).

IV.2.1.7. Récepteurs à l'insuline

Les récepteurs à insuline sont des RTK trans-membranaires. Ils sont internalisables et sont surexprimés dans certains types de cancers (hépatocarcinomes, ostéocarcinomes, neuroblastomes).

La chlorine e6 a été conjuguée à l'insuline. Le conjugué présentait une forte affinité pour le récepteur à insuline et était internalisé par endocytose active récepteur-dépendante pour la lignée cellulaire d'hépatome humain (PLC/PRF/5). De plus, la phototoxicité du conjugué s'est révélée 100 fois plus élevée pour le conjugué que pour la chlorine e6 libre (Akhlynina *et al.*, 1995).

IV.2.1.8. Ciblage nucléaire

L'utilisation d'une séquence NLS ajoutée au système PS a été très peu exploitée en PDT dans les stratégies de ciblage. Cependant, les perspectives potentielles qu'elle offre paraissent très prometteuses. Le but n'est pas d'améliorer la sélectivité vis-à-vis des cellules tumorales, mais de potentialiser l'effet de la PDT. En effet, en raison du faible rayon d'action de l'oxygène singulet (< 20 nm), la localisation intracellulaire du PS joue un rôle essentiel sur les dommages engendrés durant l'irradiation.

Plusieurs études ont montré que le couplage d'un PS avec un peptide NLS, permettait au système PS d'atteindre la cible nucléaire de façon sélective. L'irradiation de ce composé cause essentiellement des dommages sur l'ADN. Ainsi, la mort cellulaire est obtenue pour des doses de PS et de lumière bien plus faibles qu'un PS classique. L'autre avantage majeur de cette stratégie est qu'elle conduit plutôt à l'apoptose qu'à la nécrose cellulaire, diminuant les réactions inflammatoires. Le conjugué, insuline-(BSA ou polylysine-chlorine e6) couplé à des peptides NLS permet une diminution de la concentration efficace d'un facteur 2000 pour un même effet photodynamique (Akhlynina *et al.*, 1997 ; Akhlynina *et al.*, 1999 ; Bisland *et al.*,

1999). Le couplage d'une bactériochlorine à une séquence NLS a également permis d'augmenter d'un facteur 230 la phototoxicité du PS (Rosenkranz *et al.*, 2003).

Cette approche est détaillée dans la revue présentée dans le chapitre I. IV. 3. (Schneider *et al.*, 2006).

IV.2.1.9. « Photodynamic molecular beacon »

En imagerie, des sondes fluorescentes (MB, *molecular beacon*) sont activables par la technique de FRET (***F**örster **r**esonance **e**nergy **t**ransfer*). Ces sondes peuvent être utilisées pour diagnostiquer des cancers. En PDT, la toxicité est essentiellent due à la présence d'oxygène singulet. La combinaison de ces deux techniques à permis l'introduction d'un nouveau concept, « *photodynamic molecular beacon* » ou PMB.

Cette stratégie consiste à coupler un PS, *via* un peptide substrat de protéases surexprimées dans les cellules cancéreuses, à un *quencher* d'oxygène singulet ($^1O_2$). Ainsi, le PS est inactif dès lors qu'il reste conjugué au *quencher* (Figure 17). Une fois que le PS a atteint les cellules cancéreuses, le peptide substrat est clivé et le *quencher* est relargué. Le PS peut ainsi jouer son rôle de molécule photoactivable uniquement dans un environnement de cellules tumorales.

Chen *et al.* ont conjugué une pyrophéophorbide à un caroténoïde, *quencher* d'$^1O_2$, *via* un peptide substrat de la caspase-3 (Chen *et al.*, 2004a ; Stefflova *et al.*, 2006 ; Chen *et al.*, 2007). La même équipe a utilisé également un peptide substrat des metalloprotéinases MMP-7 (Zheng *et al.*, 2007).

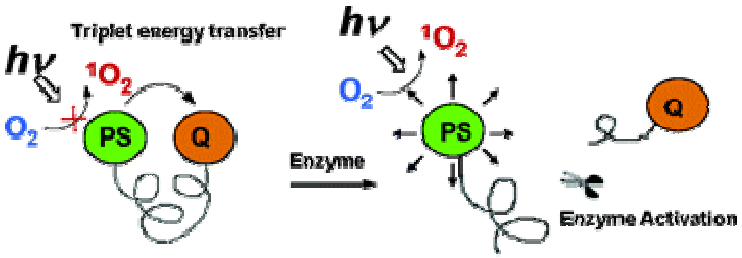


Figure 17 : Principe du PMB (*photodynamic molecular beacon*).

Le *quencher* empêche la production d'oxygène singulet. Lorsque le PS conjugué se trouve dans le tissu tumoral, le peptide ligand est dégradé par une enzyme spécifique surexprimée. Ainsi, l'activité photodynamique du PS, est possible après coupure du peptide par le système enzymatique ciblé. D'après Chen *et al.*, 2004a.

Cette approche est également détaillée dans la revue présentée dans la partie IV.3. du Chapitre I (Schneider *et al.*, 2006).

IV.2.2. Ciblage vasculaire

Le ciblage vasculaire actif en PDT est basé sur l'adressage des PSs vis-à-vis des néo-vaisseaux tumoraux. Les PSs sont ainsi retenus dans le compartiment vasculaire ce qui permet un effet vasculaire sélectif. Les molécules d'adressage utilisées peuvent être des peptides, des anticorps ou d'autres ligands reconnaissant spécifiquement des protéines surexprimées dans les néo-vaisseaux (Chen *et al.*, 2006).

De nombreux marqueurs de la vascularisation tumorale ont été identifiés pour les cellules endothéliales, les péricytes et les membranes basales (Figure 18) (McDonald et Choyke, 2003). Les principaux marqueurs des néo-vaisseaux tumoraux sont reportés dans le Tableau 8.

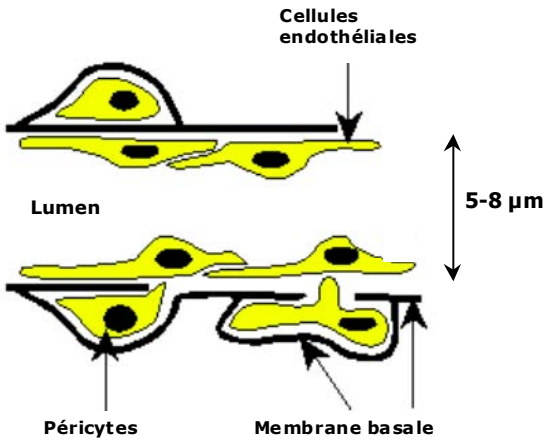


Figure 18 : Schéma d'un capillaire sanguin.

Dans les capillaires matures, la paroi du vaisseau est bordée de cellules endothéliales, d'une membrane basale (matrice extracellulaire particulière qu'on trouve à l'interface entre un **épithélium** et un autre **tissu**), et d'une couche de cellules appelées péricytes, qui entourent partiellement l'endothélium.

Les marqueurs des **cellules endothéliales** (CE) sont surtout des protéines trans-membranaires surexprimées sur les CE : récepteurs du VEGF, intégrines, endogline, récepteur à la thrombospondine-1, PSMA (*prostate-specific membrane antigen*) et TEM (*Tumor endothelial markers*). La plupart de ces protéines sont utilisées en imagerie pour cibler la néo vascularisation tumorale (McDonald et Choyke, 2003 ; Szala, 2004).

De nombreux marqueurs ; (*e.g. α-smooth muscle actin*, α-SMA), *platelet-derived growth factor receptor-β* (PDGFR-β) et *high-molecular-weight melanoma-associated antigen* (NG2)) ont été trouvés pour les **péricytes**, mais leur expression est très variable et souvent identique aux autres types cellulaires. Leur utilisation pour le ciblage de molécules reste encore a être démontrée.

Tableau 8 : Principaux marqueurs des néo-vaisseaux tumoraux.

Site d'expression	Marqueur	Type de protéine
Cellules endothéliales	VEGFR-2, Flk-1	Récepteur du VEGF
	NRP-2, neuropiline-2	Co-récepteur du VEGF
	Endogline, TEC-11, CD105	Récepteur du TGF-β
	Tsp-1, CD36	Récepteur à la thrombospondine
	Intégrines $\alpha_V\beta_3$ et $\alpha_V\beta_1$	Récepteur
	PSMA	*Prostate-Specific Membrane Antigen*
	TEM	*Tumor endothelial markers*
Péricytes	α-SMA	*α-smooth muscle actin*
	PDGFR-β	*platelet-derived growth factor receptor-β*
	NG2	*high-molecular-weight melanoma-associated antigen*
Membrane basale	Laminine	
	Fibronectine	
	Collagène IV	

Adapté d'après McDonald et Choyke, 2003.

La **membrane basale vasculaire** est un assemblage de protéines et de protéoglycanes formée par des cellules endothéliales et des péricytes. Elle est composée principalement de collagène IV, de fibronectine, de laminine et de protéoglycane héparine sulfate. Comme ces composés sont nécessaires à l'angiogenèse et sont fortement exprimés dans la tumeur, la membrane basale peut être une cible prometteuse pour le ciblage vasculaire. En effet, la fibronectine tumorale possède un extra domaine B (ED-B) utilisé pour l'imagerie de l'angiogenèse tumorale ainsi que pour la vectorisation de molécules thérapeutiques (Borsi *et al.*, 2003 ; Santimaria *et al.*, 2003).

L'adressage de PSs pour le ciblage vasculaire en PDT est une stratégie prometteuse pour les traitements de la dégénérescence maculaire liée à l'âge (DMLA) et des tumeurs richement vascularisées (*e.g.* prostate). Birchel *et al.* ont été les premiers à conjuguer un PS (chlorine e6 tin (IV)) avec un fragment d'anticorps humain (L19) possédant une forte affinité pour le fragment ED-B de la **fibronectine**. Les travaux ont montré que le conjugué permet une coagulation des néo-vaisseaux cornéens mais pas des vaisseaux sanguins des tissus sains environnants (Birchler *et al.*, 1999).

Les **intégrines** sont des récepteurs cellulaires exprimés par les cellules adhérentes et reconnaissant certains constituants de la matrice extracellulaire. Ce sont des hétérodimères constitués de deux sous-unités α et β transmembranaires associées pour former 24 intégrines différentes. Certaines intégrines (e.g. $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$, $\alpha_V\beta_1$) jouent un rôle important dans la régulation de l'angiogenèse et peuvent ainsi être utilisées comme cible pour des stratégies antivasculaires. Le tripeptide RGD possédant une forte affinité et spécificité pour l'intégrine $\alpha_V\beta_3$ (Eble et Haier, 2006), plusieurs équipes ont étudié la conjugaison d'un PS avec le motif RGD (Chaleix *et al.*, 2003 ; Chaleix *et al.*, 2004 ; Boisbrun *et al.*, 2008 ; Sol *et al.*, 2008).

Notre équipe à montré que le couplage entre une TPP et de deux séquences RGD (cyclique et linéaire), améliorait fortement, *in vitro*, l'activité photodynamique du PS sur des cellules HUVEC (*Human Umbilical Vascular Endothelial Cells*) avec des DL_{50} de l'ordre de 3 à 4 J/cm² alors que le PS non conjugué, malgré un meilleur rendement quantique d'oxygène singulet, n'a engendré aucun effet photodynamique (Frochot *et al.*, 2007).

Afin de cibler les **récepteurs au VEGF**, le peptide H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH (ATWLPPR), identifié initialement comme spécifique du VEGFR-2 (Binetruy-Tournaire *et al.*, 2000), mais reconnaissant en fait la NRP-1 (Perret *et al.*, 2004 ; Starzec *et al.*, 2006 ; Tirand *et al.*, 2006), a été conjugué à la verteporfine modifiée avec un polymère d'alcool polyvinylique (PVA), afin de traiter la DMLA, tout en n'induisant pas de dommages aux photorécepteurs (Renno *et al.*, 2004).

Dans une stratégie un peu différente, un anticorps reconnaissant non pas des récepteurs situés sur les cellules endothéliales, mais le ligand VEGF, a été couplé à de la verteporfine. La présence de l'anticorps n'induit pas de changement notable des caractéristiques photophysiques du PS, mais les tests *in vitro* n'ont pas montré d'amélioration significative de l'activité photodynamique du PS suite au couplage (Mayo *et al.*, 2003).

Un autre peptide H-Ala-Pro-Arg-Pro-Gly-OH (APRPG) a été isolé, par *phage display* à partir d'une banque de peptides de 15 résidus d'acides aminés, par affinité pour les cellules endothéliales angiogéniques ainsi que par intéractions avec la surface de liposomes pegylés contenant du BPD-MA (Ichikawa *et al.*, 2005). Ces liposomes pegylés, ornés ou non du peptide, s'accumulent dans le tissu tumoral environ 4 fois plus que les liposomes non pegylés, 3 heures après injection. Si la présence du peptide n'influe donc pas sur le taux d'accumulation du PS dans la tumeur, elle agit de façon importante sur sa localisation intratissulaire (Maeda *et al.*, 2006). La présence du peptide permet en effet une accumulation

du PS au niveau endothélial et une nette amélioration de l'efficacité photodynamique, par un effet anti-vasculaire (Ichikawa *et al.*, 2005).

L'utilisation de peptides pour un ciblage vasculaire actif est décrite plus en détail dans la revue présentée dans la partie IV.3. (Schneider *et al.*, 2006).

IV.3 Intérêt des ligands peptidiques dans les stratégies de ciblage en thérapie photodynamique

IV.3.1. Introduction

La publication présentée ici est une revue complète détaillant l'utilisation des peptides pour un ciblage en PDT. Dans le cadre d'un ciblage passif, les peptides peuvent être utilisés afin de modifier la balance hydrophile/hydrophobe des PSs. Des peptides chargés peuvent également être utilisés. Dans le cadre d'un ciblage actif, les peptides vont permettre l'adressage des PS vis-à-vis de la tumeur, des vaisseaux tumoraux ou du noyau cellulaire.

L'attractivité des peptides pour des utilisations en PDT repose notamment sur leur petite taille, qui facilite la diffusion des PSs conjugués dans les tissus, et sur leur facilité de synthèse. Cependant, un des inconvénients majeurs liés à l'utilisation des peptides repose sur leur **manque de stabilité** *in vitro* et *in vivo*, pouvant compromettre la stratégie de ciblage. En effet, le plasma contient des peptidases (ou protéases), enzymes protéolytiques de type hydrolase qui dégradent les chaînes peptidiques depuis le N- ou le C-terminal (exopeptidases, appelées aminopeptidases et carboxypeptidases, respectivement) ou qui hydrolysent les liaisons peptidiques internes entre deux acides aminés (endopeptidases).

IV.3.2. "Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy"

Schneider, R., Tirand L., Frochot C., Vanderesse R., Thomas N., Gravier J., Guillemin F., Barberi-Heyob B.
Anticancer Agents Med Chem, 2006, 6(5):469-88.

Recent Improvements in the Use of Synthetic Peptides for a Selective Photodynamic Therapy

Raphaël Schneider[1,*], Loraine Tirand[2], Céline Frochot[3], Régis Vanderesse[4], Noémie Thomas[2], Julien Gravier[5], François Guillemin[2] and Muriel Barberi-Heyob[2]

[1]LCPME, Groupe Thiols UMR CNRS-UHP 7564 Faculté de Pharmacie, 30 rue Lionnois, BP 80403, F-54501 Nancy, France; [2]Centre Alexis Vautrin-CRAN, UMR 7039 CNRS-UHP-INPL, Avenue de Bourgogne, F-54511 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France; [3]DCPR-GRAPP, Groupe ENSIC-UMR 7630 CNRS-INPL, 1 Rue Grandville, F-54001 Nancy, France; [4]LCPM, Groupe ENSIC-UMR 7568 CNRS-INPL, 1 Rue Grandville, F-54001 Nancy, France and [5]UMR CNRS-UHP 7565, Faculté des Sciences, BP 239, 54506 Vandoeuvre-les-Nancy, France

Abstract: Photodynamic therapy (PDT) is a relatively new cytotoxic treatment, predominantly used in anti-cancer approaches, that depends on the retention of photosensitizers in tumor and their activation after light exposure. Photosensitizers are photoactive compounds such as porphyrins and chlorins that upon photoactivation, effect strongly localized oxidative damage within the target cells. The ability to confine activation of the photosensitizer by restricting illumination to the tumor allows for a certain degree of selectivity. Nevertheless, the targeted delivery of photosensitizers to defined cells is a major problem in PDT of cancer, and one area of importance is photosensitizer targeting. Alterations or increased levels in receptor expression of specific cellular type occur in the diseased tissues. Therefore, photosensitizers can be covalently attached to molecules such as peptides, leading to a receptor-mediated targeting strategy. These active-targeting approaches may be particularly useful for anti-vascular PDT. Moreover, it has been shown that the photocytotoxicity of photodynamic drugs could be enhanced by delivering high amounts of a photosensitizer into subcellular organelles such as the nucleus where nucleic acids represent target molecules sensitive to photodamage.

The recent progresses in the use of active-targeting strategy with synthetic peptides and the interest of using an active-targeting strategy in PDT, which could allow efficient cellular internalization of photosensitizers, are described in this review.

Key Words: Photosensitizer, photodynamic therapy, synthetic peptides, targeted delivery, nuclear localization sequence.

INTRODUCTION

Photodynamic therapy (PDT) is a novel treatment, used mainly for anticancer therapy, that depends on the retention of photosensitizers in tumor cells and irradiation of the tumoral tissue with a light of an appropriate wavelength. PDT is being developed as a treatment for cancer of the esophagus [1], bronchi [2,3] and bladder [4,5], as well as for other non-oncological applications, such as the treatment of age-related macular degeneration [6]. PDT is also used as a successful non-invasive therapeutic modality for treating cutaneous neoplasm [7,8]. A limitation of PDT is that it cannot cure advanced disseminated disease because irradiation of the whole body with appropriate doses is not possible. Nevertheless, for advanced disease, PDT can enhance quality of life and lengthen survival. For early or localized disease, PDT can be a selective and curative therapy with many potential advantages over available alternatives.

The photosensitizer is classically defined as a chemical entity, which, upon absorption of light, induces a chemical or physical alteration of another chemical entity. Early preparations of photosensitizers for PDT were based on a complex mixture of porphyrins called haematoporphyrin derivative. One of them, porfimer sodium (Photofrin®), was the first drug to receive approval for PDT. Porfimer sodium has been used in thousands of patients for more than 20 years and no long-term safety issues have emerged. Despite the continuing effectiveness of porfimer sodium, it has several disadvantages. The drug induced protracted skin photosensitivity, and the initial selectivity for the tumor tissue was low [9,10]. With the exception of porfimer sodium, the only other PDT compound currently approved for systemic use in cancer treatment is temoporfin. Temoporfin (*meta*-tetra(hydroxyphenyl)chlorin, *m*-THPC, Foscan®) is effective for the palliative treatment of head and neck cancer and it was approved in Europe for this indication in 2001. Nevertheless, like porfimer sodium, temoporfin is also associated with a pronounced skin photosensitivity and exhibits a weak selectivity between tumor and healthy tissue [11]. The benzoporphyrin derivative verteporfin (Visudyne®) was also recently approved, but it has only been developed for the treatment of age-related macular degeneration, and not indicated for cancer [12]. Concerning photosensitizers for topical application to treat skin lesions, protoporphyrin IX (PpIX) can be produced in nucleated cells after topical application of either aminolevulinic acid (ALA) or methyl aminolevulinate (mALA) to the site of a skin cancer or precancerous lesion.

*Address correspondence to this author at LCPME, Groupe Thiols, UMR CNRS-UHP 7564, Faculté de Pharmacie, 30 rue Lionnois, BP 80403, F-54501 Nancy, France; Tel: + 33 3 83 68 21 56; Fax: + 33 3 83 68 21 54; E-mail: Raphael.Schneider@pharma.uhp-nancy.fr

This finding has led to approval of ALA in the USA, and of mALA in Europe [13]. A mixture of aluminium sulphonated phthalocyanine (Photosense) has been used widely in Russia but not in any other country [14].

The selectivity of PDT relies both upon the targeting of the light delivery and on the preferential uptake of the photosensitizer by malignant tissue. Actually, some photosensitizing drugs can reach higher concentrations in tumor tissue than in surrounding healthy tissue. Although the exact mechanisms that drive this process are not fully understood, the abnormal physiology of tumors (poor lymphatic drainage, leaky vasculature, abnormal stoma composition, decreased pH, increased number of receptors to low density lipoprotein, LDL) might contribute to the selectivity of photosensitizers [15,16]. Since the majority of photosensitizers are taken up non-selectively by all cell types studied *in vitro*, they can accumulate in tumor, but also in normal cells. The low selectivity in terms of cytotoxicity in conventional PDT is one of the limitations of the approach. Although there may be some preferential uptake of photosensitizers by tumor cells [17], an interesting strategy to enable the dose of photosensitizer administered to patients to be reduced and hence minimize the side effects of PDT, is to increase the effectiveness of tumor-cell filling through targeted delivery. To provide selective delivery of photosensitizer to a tumoral tissue, investigators have turned towards the targeted photosensitizers approach including monoclonal antibody (MoAb). The strategy consists of linking photosensitizer with MoAb against specific antigens of malignant cells. Theoretically, MoAb hold great promise for facilitating the transport of photosensitizer to cellular targets because of the specificity of MoAb-antigen interactions [18-20]. The direct attachment of molecules to MoAb is easy to carry out and has advantage of occurring under mild conditions. Nevertheless, it has not provided total satisfaction since an increase in the degree of substitution leads to a significant loss of antigenic specificity of the MoAb. The loss of antibody activity is probably due to some modifications in the physico-chemical properties of the MoAb [21]. This limits the molar photosensitizer-to-antibody ratios. Moreover, binding hydrophobic photosensitizer may alter the antibody solubility and decrease the number of photosensitizer that can be delivered by one antibody [22]. In addition, this approach does not appear easily reproducible since the conjugation occurred randomly and as proteins contain amino and carboxyl groups, both intra- and intermolecular cross-linking in the MoAb molecule can occur [23]. Furthermore, there are two other major limitations in antibody-targeted therapy: large size and non-specific uptake of the antibody molecules by the liver and the reticulo-endothelial system [24]. Anti-tumor MoAb exhibit low tissue penetration and poor cellular uptake when used *in vivo* [25]. Small peptides that selectively recognize tumor cells should overcome some of these limitations and represent excellent targeting agents for receptors over-expressed in human cancers.

Peptides are molecules consisting of several amino-acids linked together through amide bonds. Peptides differ from proteins, which are also long chains of amino-acids, by virtue of their size, the informal dividing line being at approximately 50 amino-acids in length. In contrast to proteins, peptides generally do not possess a well-defined three-dimensional (tertiary) structure [26]. Moreover, peptides do not only exist in natural form but can also be designed synthetically as novel molecules. In addition, the effective tissue penetration of short synthetic peptides, in combination with their selective binding and internalizing capacity by cancer cells, make peptides ideal candidates for the delivery of therapeutic agents such as photosensitizers (Table **1**). Peptides are quite easily synthesized and modified. However, their natural structural conformation makes them extremely sensitive to endo- and exo-peptidases present in most tissues (Table **1**). In order to be used as targeting agents, peptides can be chemically modified. In this respect, the introduction of D-amino-acids, or pseudo amino-acids, and peptide cyclization are the most common strategies to increase peptide stability [27]. One of the main reasons for the increasing interest in peptides for anti-cancer strategy is the possibility of receptor targeting, these receptors being often over-expressed in many human cancers. Moreover, peptides have virtually no cytotoxicity and they are most often agonists for their targeted receptors, which confers the internalization (Table **1**).

Excepted for the normal blood-brain barrier, peptides are characterized by an interesting permeability leading to an easy and rapid access to the tumor after systemic injection. However, peptides may be able to penetrate through the blood-brain barrier when the latter is disturbed, as described for glioblastomas. The differentially expressed cell surface markers on endothelial cells in angiogenic vessels of tumors are also excellent targets for site-specific PDT. Peptides are usually rapidly excreted from the body. This will occur through renal or hepatobiliary excretion or both, depending on the peptide and the type of structural modifications performed on it. It should be added that the rapid clearance of peptides is also a disadvantage leading to a reduced bioavailability (Table **1**).

This review will be restricted to synthetic peptides coupled to photosensitizers to improve PDT of cancer. Particular attention will be given to photosensitizer-peptide conjugates for active tumor targeting. It is noteworthy that most of the precedent work described in this area has used proteins. None of the currently available photosensitizers, including both clinically approved and preclinical drugs, is known to localize in the nucleus. A logical goal of drug design for PDT would be a general method for nuclear photosensitizer delivery, as several peptide sequences have nuclear localizing properties. With the aim to increase the biological effectiveness of photosensitizers, structure-activity relationships of different peptides have been widely reported in the literature. Use of native, associated or substituted synthetic peptides could result in modifications of self-assembly photosensitizers, while variations in the tendency of the conjugate to aggregate are in relation with the number, nature, charge and sequence of amino-acids in the peptide. New concepts of photosensitizer-peptide conjugates in which synthetic peptide sequences were used as specific cleavable or biodegradable substrates for cellular peptidases will also be reported.

PEPTIDES FOR A PASSIVE TARGETING

The primary photosensitizers, e.g. porfimer sodium, displayed an important tendency to aggregate, with hydrophobic interactions between their planar aromatic cores, leading to strong photosensitizer-photosensitizer interactions which

Table 1. Advantages and Disadvantages of Peptides as Targeting Agents

Advantages	Disadvantages
Small molecules	Potentially degraded by endo- and/or exo-peptidases
Good tissue permeability	Do not cross a normal blood-brain barrier
Virtually no cytotoxicity	Too rapid clearance
Rapid access to the tumor site	
Cross a disturbed blood-brain barrier	
Low antigenicity	
Easy to synthesize	
Easy to modify chemically	
Easy to link to spacer	
Easy to link to chelators	
Easy to radiolabel	
High-affinity receptor binding	
Rapid clearance from the body	
Agonists for their targeted receptor (internalization)	

could affect their photophysical, photochemical and biological properties. Actually, due to their chemical structure, most photosensitizers tend to aggregate in aqueous media as a result of the propensity of the hydrophobic skeleton to avoid contact with water molecules [28]. This phenomenon hinders the efficacy of the photosensitizer *in vivo*, by increasing its bioavailability in all tissues, including healthy ones, and by limiting its light absorbance and decreasing its triplet state yield. An approach developed by several groups is to modulate the amphiphilicity of the photosensitizer. In this aim, two main strategies have been employed to deliver photosensitizers into cells *via* a passive targeting using amino-acids. The first one is to modify the hydrophilic/hydrophobic balance of the drug by introducing peptides, and the second one is to add charges to the photosensitizer by coupling charged peptides.

Use of Peptides to Improve the Hydrophilic/Hydrophobic Balance

In order to change the hydrophilic/hydrophobic balance, hydrophobic photosensitizers such as phthalocyanines, have been coupled with one or several amino-acids. Dreschsler *et al.* [29] increased water solubility of the phthalocyanine macrocycles by adding alanyl and seryl moieties in the photosensitizer periphery (Fig. **1**). As expected, the two compounds exhibited good or excellent water solubility and a weak tendency to form aggregates in solution. Phototoxicity towards T47D human mammary carcinoma cells was investigated. The results showed that the tetra-aminoacid photosensitizer had a poor phototoxicity and that the serine derivative even exhibited a dark toxicity.

Recently, Haywood-Small *et al.* [30] investigated photodynamic cell cycle deregulation and cell death with different zinc phthalocyanines derivatives in SiHa human cervical carcinoma cells. They compared the efficiency of the zinc phthalocyanine tetra-sulfonic acid (TSPc) with derivatives containing amino-acids with various alkyl chain lengths (Fig. **2**). These conjugates were more hydrophobic than TSPc but water solubility was maintained. The aminohexanoic acid derivative was the most effective photosensitizer (dose yielding 50% growth inhibition, IC_{50} = 171 ± 12 μM com-

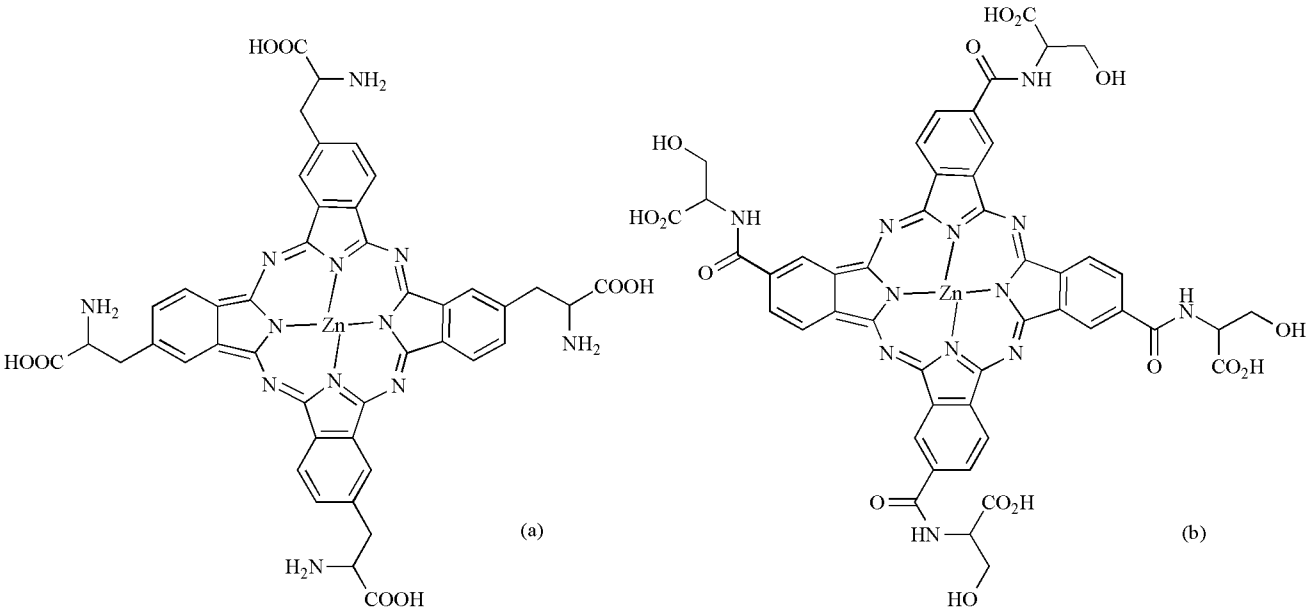


Fig. (1). Structure of amino-acids functionalized zinc phthalocyanines.

pared to 216 ± 17 μM for TSPc). *In vivo* tests in rodent model systems seemed to be promising.

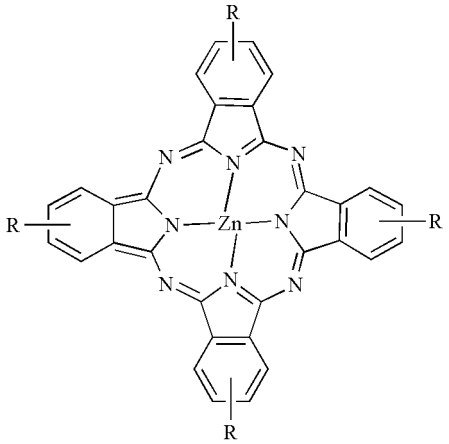
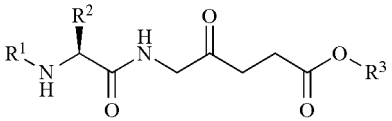


Fig. (2). Phthalocyanine derivatives : TSPc R = SO_3^-, glycine R = $SO_2NHCH_2COO^-$, α-alanine R = $SO_2NHCH(CH_3)COO^-$, β-alanine R = $SO_2NH(CH_2)_2COO^-$, aminobutyric acid R = $SO_2NH(CH_2)_3COO^-$, aminovaleric acid R = $SO_2NH(CH_2)_4COO^-$, aminohexanoic acid R = $SO_2NH(CH_2)_5COO^-$.

Aminolevulinic acid (ALA) is a well-known metabolic precursor in the biosynthetic pathway of haem and leads to the formation of protoporphyrin IX (PpIX). ALA is however a zwitterion at physiological pH, and a poor penetration into cellular membranes is classically observed for such compounds. Casas *et al.* [31] synthesized several esterified ALA derivatives (three of them containing an amino-acid, Table **2**) with the goal to increase their lipophilicity.

Table 2. ALA Derivatives Prepared by Casas *et al.*



R^1	R^2	R^3	Name
Z	H	$(CH_2)_3CH_3$	Z-Gly-ALA-OHex
Z	H	CH_2CH3	Z-Gly-ALA-OEt
Z	CH_2-Bz	CH_2CH_3	Z-*D*-Phe-ALA-OEt

The authors showed that excepted Z-*D*-Phe-ALA-OCH_2CH_3, which had a marginal increase in rat skin at the three investigated concentrations (0.6, 1.2 and 2 mM) and in human skin at 2 mM (P = 0.04), the highest level of PpIX formation assessed by fluorescence was induced by non-modified ALA. Functionalization by amino-acids moieties did not, therefore, significantly improve the efficiency of ALA to produce PpIX.

Use of Charged Peptides

As previously shown, another strategy to increase the uptake of the photosensitizers into cells is to modify their charge. Numerous cationic peptides have already been used, especially polylysine and polyarginine since they enter into cells efficiently and can guide the cellular uptake of numerous agents [32]. This phenomenon is related to their molecular weight and to the net negative charge on the surface of most eukaryotic cells. For arginine-rich peptides, the positively charged guanidinium group is able to form bidentate hydrogen bonds with membrane-containing phosphate groups. Furthermore, the positively charged molecules can potentially target the most vulnerable intracellular sites, such as mitochondria and nuclei and then increase the biological effectiveness of photosensitizers.

Hasan's group used a poly-*L*-lysine linker to couple both chlorin *e*6 (Ce6) and the F(ab')2 fragment of the murine antiovarian cancer monoclonal antibody OC125, resulting in a photoimmunoconjugate with a pronounced cationic charge, for PDT of disseminated abdominal metastases of ovarian cancer [33-35].

In order to investigate the nature and the number of charges for an optimal uptake, Sibrian-Vazquez *et al.* [36] prepared 14 conjugates from a model porphyrin (4-amino-*meso*-tetraphenylporphyrin), by coupling with charged amino-acids and peptides of different sizes and composition, containing lysine and arginine residues, and evaluated their cytotoxicity, their cellular uptake and their localization in HEp2 cells compared to a non-conjugated porphyrin (Fig. **3**).

The authors showed that the number, the nature, the sequence of amino-acids, the presence of a chelated metal ion and the C-termination (OH *vs* NH_2) affected the cellular uptake of the conjugates. The compounds that accumulated the most within cells were the ones with at least three consecutives arginine residues (R^2 = H-Arg-Arg-Arg-NH_2 and H-Lys-Arg-Arg-Arg-NH_2), whereas the tri-lysine metal complex (with Sn(IV)) accumulated the least (about 10-fold). All compounds showed low dark cytotoxicity (IC_{50} > 250 μM), and localized mainly in cellular vesicles and lysosomes, probably *via* an endocytic pathway. On the contrary, in the presence of a lipid delivery vehicle, the main subcellular sites of localization were the mitochondria. Positively charged peptides can also be used in the photoinactivation of bacteria and viruses. Small cationic peptides with antimicrobial properties are part of the innate immune response of a wide variety of animal species. Many naturally occurring anti-bacterial peptides which have in common *inter alia* a pronounced polycationic charge have been discovered [37].

Gram-negative bacteria are resistant to a large number of noxious agents as a result of the effective permeability barrier function of their outer membrane. As first shown by Vaara *et al.* [38], the lysine polymer ($lysine_{20}$) is an effective permeabilizer. A concentration of $lysine_{20}$ as low as 0.3 to 3 μg/ml is sufficient to sensitize *Escherichia coli* and *Staphylococcus typhimurium* to hydrophobic antibiotics. The polylysine has been widely used for therapeutic purposes. However, it is well known that polylysine, as well as other polycations, is somewhat toxic to cells [39]. Recently, Tome *et al.* [40] described new conjugates used in the photoinactivation of antibiotic-resistant gram-positive bacteria (*Staphylococcus aureus* strains ATCC 25923 and MRSA 110) and gram-negative bacteria (*Escherichia coli* strain O4) (Fig. **4**). The synthesis, structural elucidation, and biological evalua-

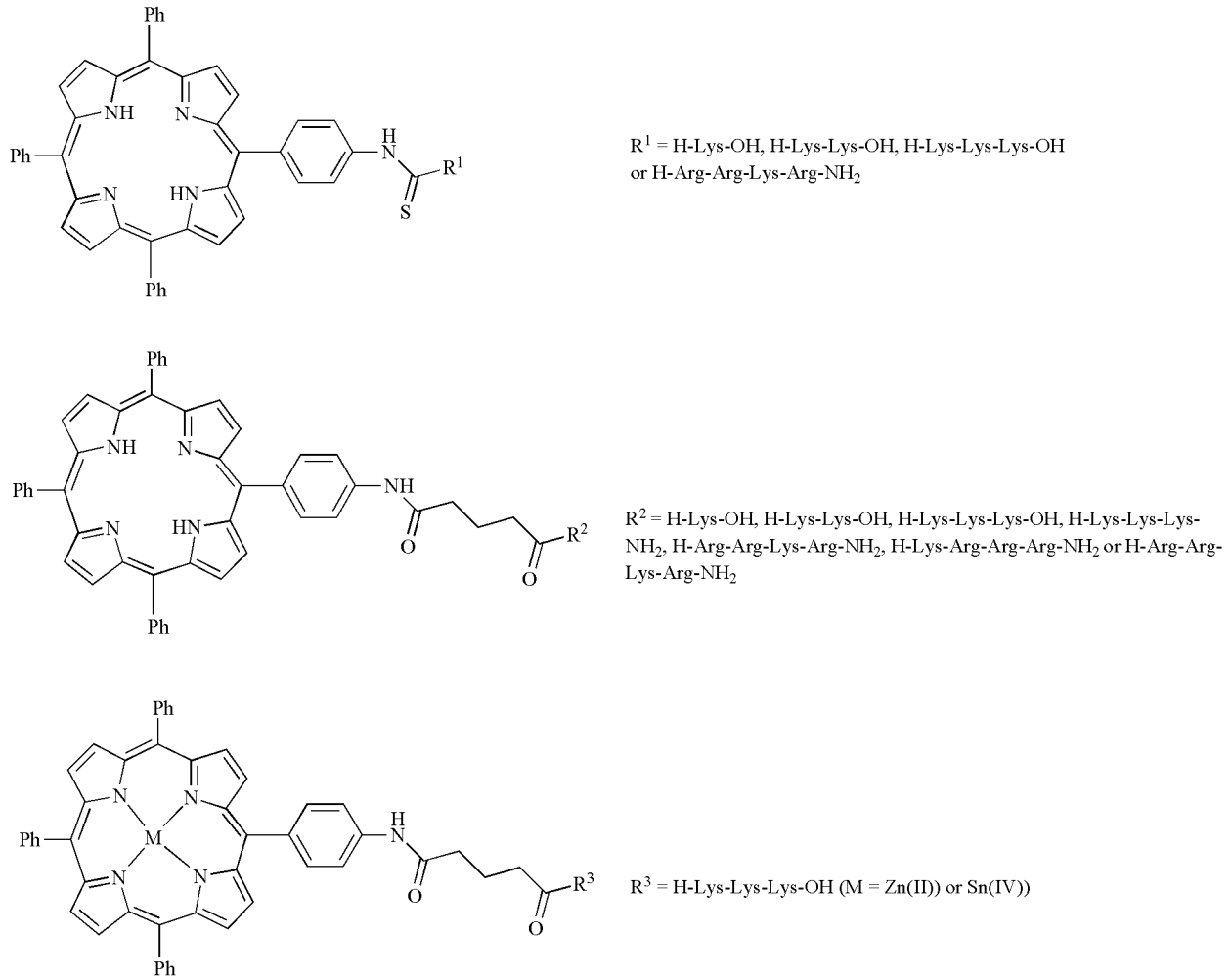


Fig. (3). Structure of charged porphyrins prepared by Sibrian-Vazquez *et al.*

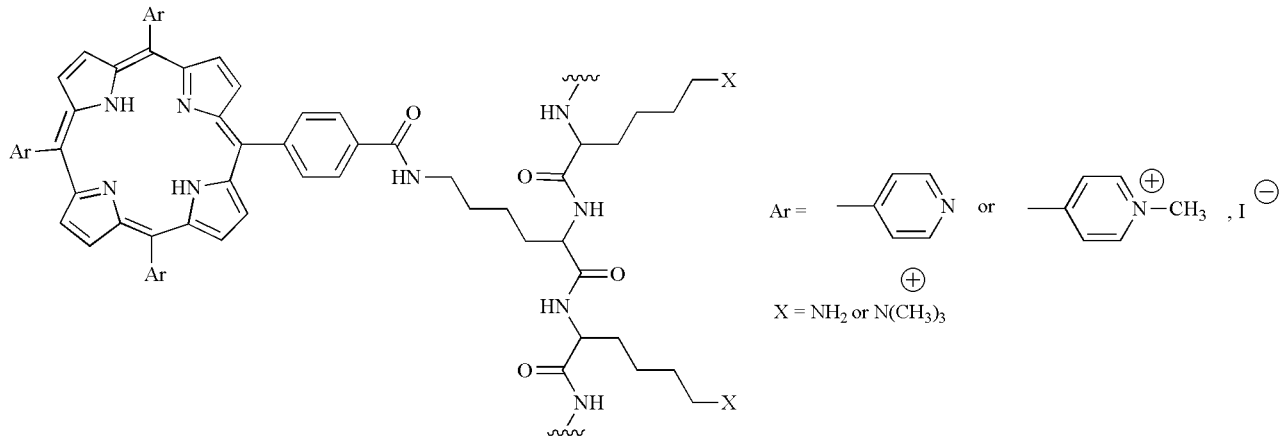


Fig. (4). Structure of the polylysine-Ce6 conjugates developed by Tome *et al.*

tion of new conjugates of polylysine with *meso*-substituted porphyrins were performed.

The authors showed that the cationic conjugates were able to induce an efficient photoinactivation for both types of bacteria (positive charges are required to photoinactivate gram (-) cells) and that polylysine significantly increased the activity of the photosensitizers.

Hasan's group also explored the light activation of targeted polylysine-Ce6 conjugates for anti-microbial therapy [41]. Their goal was to induce the photodestruction of gram-

positive (*Actinomyces viscosus*) and gram-negative (*Porphyromonas gingivalis*) oral species while sparing the HCPC1 oral epithelial cell line. Conjugates polylysine-Ce6 (average size, 20 lysine residues) having a positive, neutral (by acetylation at the ε-NH_3^+), or negative charge (by succinylation at the ε-NH_3^+), were tested (Fig. **5**). For *Porphyromonas gingivalis* and *Actinomyces viscosus*, the cationic conjugate (5 µM) induced 99% killing. Finally, the data suggested that the cationic polylysine-Ce6 conjugates might have an application for the PDT of periodontal disease.

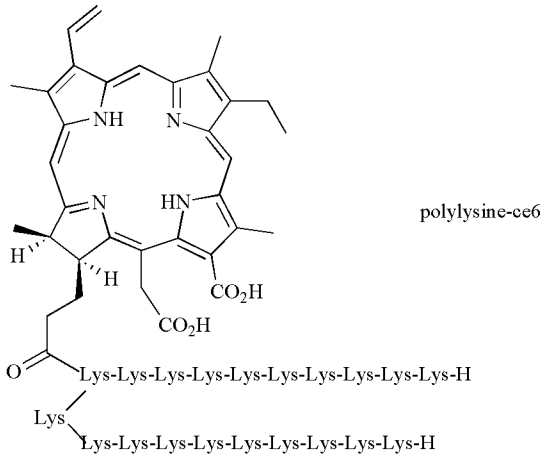


Fig. (5). Structure of the polylysine (pL)–chlorin *e6* (pL-Ce6) adduct prepared by Soukos *et al.*

Rovaldi *et al.* [42] used the same Ce6 linked to a lysine pentamer and demonstrated that complete killing of *Porphyromonas gingivalis* cells was induced by irradiation in the presence of 5 µM of the chlorin conjugate. It is likely that the addition of four net charges to Ce6 leads to a stronger affinity for binding to bacterial surfaces.

PHOTOSENSITIZER-PEPTIDE CONJUGATES FOR ACTIVE TUMOR TARGETING

The main advantage of PDT over other anti-cancer treatments relies on its dual selectivity, which results from the restriction of photosensitizer activation to the tumor site due to localized light irradiation. This allows the tumor to be treated, while minimal damage is caused to healthy tissues. However, many first and second generation photosensitizers are distributed fairly equally in both healthy and tumor cells, which causes post-therapeutic complications, such as long-lasting skin photosensitivity [16]. Targeted PDT, using third generation photosensitizers, might enable specific and enhanced retention of photosensitizers to tumors and allow more selective PDT with minimal adverse effects. If photosensitizer-antibody conjugates have been the subject of the most intense investigations in the past (for a review, see [43]), they appeared to present some major limitations: large size and, thus, poor tumor penetration, nonspecific uptake of the antibody molecules by the liver and the reticulo-endothelial system [24] and, often, the absence of cellular internalization [25]. Thus, research has focused on the targeting of receptors - rather than antigens - that are preferentially expressed in tumor tissues. In spite of numerous encouraging *in vitro* results using proteins as ligand (for a review, see [25]), peptides are molecules that have widely been described for targeted chemotherapy [44] and that now appear to be interesting candidates for targeted PDT.

Design of Photosensitizer-Peptide Conjugates

In order to endow the photosensitizer with active-targeting characteristics, one or several homing peptides can be covalently coupled :

- either directly to the photosensitizer [45-49];
- or to a polymer scaffold to which the photosensitizer molecules are attached [50];
- or be used to modify liposomes encapsulating the photosensitizer [51] (Fig. **6**).

Photosensitizer coupling can be conveniently achieved by a classical solid phase peptide synthesis methodology [46-49], or in homogeneous solution [45].

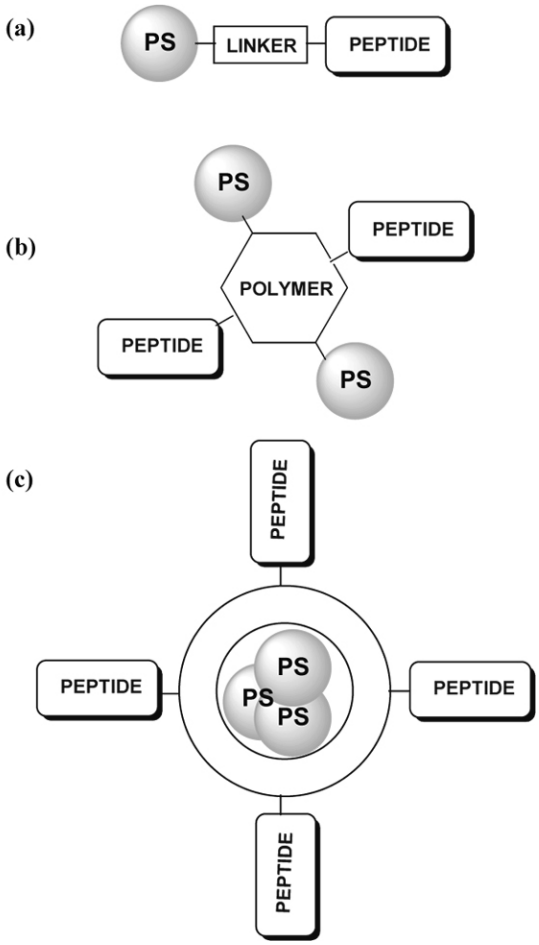


Fig. (6). Various peptide-targeting approaches for PDT: (a) monomeric peptides directly conjugated to the photosensitizer (PS), (b) multimeric peptides and photosensitizers with a polymeric scaffold, and (c) photosensitizer loaded liposome decorated with homing peptides.

The main challenge is to conjugate the peptide to the photosensitizer without affecting its receptor binding properties. Indeed, the affinity of the peptide for its receptor may

be altered through conformational changes subsequent to the coupling to the photosensitizer [45-47]. It is important to determine which amino-acids are essential for receptor recognition, in order to identify the best binding site of photosensitizer attachment on the peptide [46,47].

Homing Peptides Targeting Tumor Cells

De Luca *et al.* described the synthesis of 5,10,15-tris(2,6-dichlorophenyl)-20-(4-carboxyphenyl)porphyrin (abbreviated PK) covalently bound to the peptide hormone cholecystokinin CCK8 (H-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2), using Lysine as a spacer (Fig. **7**). CCK8 is known to interact with CCK_A, a receptor that is over-expressed in some colonic, gastric and brain cancers [46]. A molecular dynamics study indicated that the conformational features of the CCK8/CCK_A receptor-model complex and of the PK-CCK8/CCK_A receptor-model complex were very similar. A NMR conformation study of the PK-CCK8 conjugate was also carried out in DMSO because the presence of the porphyrin moiety strongly decreases the solubility of PK-CCK8 in aqueous solution. No Nuclear Overhauser Effect correlation between the porphyrin ring protons and the peptide chain of the molecule were observed, indicating that the porphyrin macrocycle does not lie close to the peptide moiety of PK-CCK8, thus confirming the results of the preliminary computational study. The authors concluded that the presence of the bulky porphyrin substituent at the *N*-terminus of CCK8 does not interfere with the conformation of the peptide residues supposed to be involved in receptor binding.

In order to further individualize the two moieties of the photosensitizer-peptide conjugates, different linkers/spacers have been used, e.g. carboxylic acids [47,49] or a lysine residue [45,46]. Both the nature and the length of the spacer can impact on receptor affinity [52], and have to be optimized.

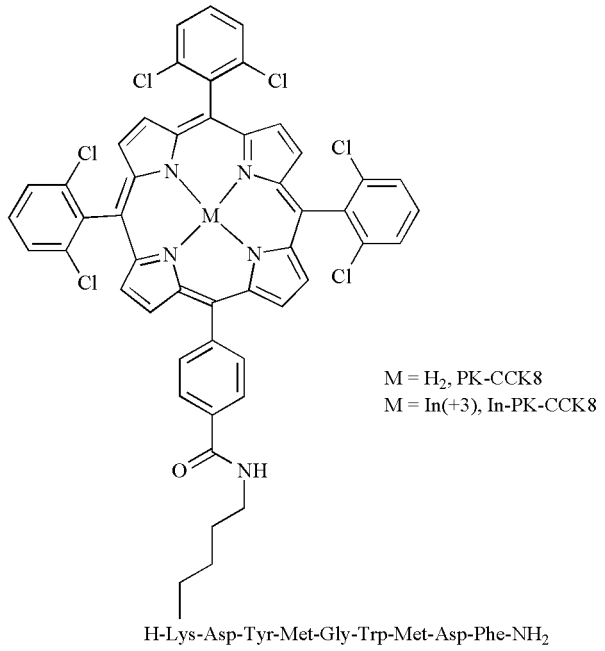


Fig. (7). Structure of the PK-CCK8-PK conjugates.

If the natural ligands for some receptors are peptides [53], the extended use of combinatorial library methods, e.g. the phage-display library technique, has allowed the identification of new peptidic ligands with little or no amino-acid sequence homology to other known naturally-occurring human sequences [25,54]. Several of these synthetic peptides have been used to target photosensitizers, either to cancer cell surface receptors, or to endothelial cell surface receptors of the neovasculature (Table **3**).

Rahimipour *et al.* described the coupling of protoporphyrin IX to peptides acting as gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonists or antagonists (Table **3**) with the goal to selectively target GnRH receptors that are over-expressed in many prostate and breast tumors (Fig. **8**) [45]. The peptide-photosensitizer conjugates obtained exhibited binding affinity for GnRH receptors, as assessed *in vitro* by displacement assays using ^{125}I[D-Lys^6]GnRH as the radioligand. The affinity of the photosensitizer-peptide conjugates was found to be lower than that of the corresponding peptide (IC_{50} = 22 and 1.1 nM, respectively, in the case of the GnRH agonist, and IC_{50} = 1.8 µM and 6 nM, respectively, in the case of the GnRH antagonist). Photodynamic activity was however enhanced (about 1.5-fold) in GnRH expressing-pituitary gonadotrope αT3-1 cells, compared to unconjugated protoporphyrin IX. The photodynamic activity of the conjugates was alleviated by co-incubation with the parent peptide, indicating that phototoxicity was receptor-mediated. Interestingly, in addition to their tumor-targeting properties, the peptide moiety conferred a systemic activity to the peptide-photosensitizer conjugates in the absence of any light irradiation, by acting on luteneizing hormone levels [45].

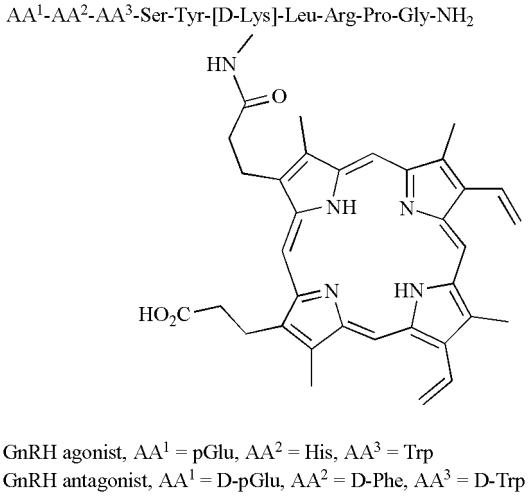


Fig. (8). Protoporphyrin IX-peptides adducts prepared by Rahimipour *et al.*

Homing Peptides Targeting Tumor Vasculature

Tumor-associated blood vessels and angiogenesis-based research have become one of the most promising and actively explored fields for the development of experimental therapeutics against a variety of tumor types. Indeed, angiogenesis (the formation of new blood vessels from pre-existing ones) is a critical step in tumor development, that

allows growth beyond 2-3 mm^3 [55]. Vascular targeting agents are designed to bind selectively to components of the tumor vasculature and deliver an effector molecule that directly damage blood vessels and thereby kill tumor cells by starving them of oxygen and nutrients [56]. Using a photosensitizer as the effector molecule, this strategy could help potentiate the vascular effect of PDT, that is thought to play a major part in tumor eradication [51].

This approach has several advantages:

(i) the tumor endothelial cells are directly accessible to intravenously administrated photosensitizer thus permitting a rapid localization of a high percentage of the injected dose;

(ii) the molecular oxygen required for photochemical reactions is also more readily available;

(iii) since each capillary provides oxygen and nutrients for thousands of tumor cells, occlusion of the vessel has an amplified effect on tumor cells;

(iv) the outgrowth of mutant endothelial cells lacking the target antigen is unlikely because they are a normal, genetically stable cell population;

(v) and, finally, since tumor vessels share common morphological and biochemical properties, this strategy should be applicable to different tumor types [57].

Unlike normal human endothelial cells which are mostly quiescent, endothelial cells in tumors express several target features associated with their angiogenic activation [57]. Ichikawa *et al.* prepared liposomes encapsulating benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD-MA), that were modified with polyethylene glycol (PEG) in order to improve their pharmacokinetic properties, and with the APRPG (H-Ala-Pro-Arg-Pro-Gly-OH) pentapeptide, which is specific to angiogenic endothelial cells [51]. The PEG moiety was solely responsible for the increased uptake of BPD-MA by Meth-A sarcoma tumor tissues (4-fold) but, in the absence of the APRPG sequence, a decrease of the drug activity for PDT was observed. The APRPG moiety seemed necessary for intracellular internalization of the photosensitizer, which would otherwise be mainly located in the interstitial space of the tumor, where short-lived singlet oxygen ($^1O_2$) could not exert any cytotoxic action. APRPG-PEG-Lip BPD-MA-mediated PDT caused vasculature damage, as observed in the dorsal air sac angiogenesis model, and strongly suppressed tumor growth.

The $\alpha_v\beta_3$-integrin, a heterodimeric transmembrane glycoprotein receptor, is also over-expressed in many tumor cells, such as osteosarcomas, neuroblastomas and lung carcinomas, but also in actively proliferating endothelial cells in and around tumor tissues. Chaleix *et al.* reported the solid-phase synthesis of four porphyrins bearing the $\alpha_v\beta_3$-integrin ligand RGD (H-Arg-Gly-Asp-OH) tripeptide [48]. Three of the conjugates prepared displayed photodynamic activity on the K562 leukemia cell line to a degree comparable to that of Photofrin II®. The authors later described the synthesis of a cyclic peptide containing the RGD motif and adopting conformations showing an increased affinity for integrins [49]. In the ring closing metathesis method used for synthesis, the enzymatically-sensitive disulfide bond of the cyclic CRGDC thiopeptide previously described, is replaced by a carbon-carbon double bond in order to increase the plasmatic lifetime of the peptide. A low substituted resin (0.1 mmol/g) was used in order to avoid intermolecular reactions and thus to increase the reaction yield. Carboxy-glucosylporphyrins coupled to this peptide *via* a spacer arm showed the same efficiency for $^1O_2$ production as hematoporphyrin but to the best of our knowledge, no *in vivo* study on these compounds has been reported yet (Fig. **9**).

Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) is considered as the key mediator of angiogenesis in cancer; it is involved in the proliferation and migration of endothelial cells. VEGF binds two kinase receptors (VEGFR-1/Flt-1 and VEGFR-2/ Flk-1/KDR), which are expressed almost exclusively on vascular endothelial cells and over-expressed during angiogenesis. It binds also to neuropilins (NRP-1 and NRP-2), which are expressed not only on endothelial cells, but also on the surface of some tumor cells [58]. The heptapeptide ATWLPPR (H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH) has been selected by phage display, by binding to an anti-VEGF neutralizing antibody, and was initially considered to bind to kinase domain receptor (KDR) [59]. Renno *et al.* used an ATWLPPR-polyvinyl alcohol-verteporfin conjugate, in order to treat choroidal neovascularization secondary to age-related macular degeneration [50]. A time of 1h after intravenous injection was chosen for PDT treatment, as a peak intensity of the targeted verteporfin in choroidal neovascularization was detected angiographically at this

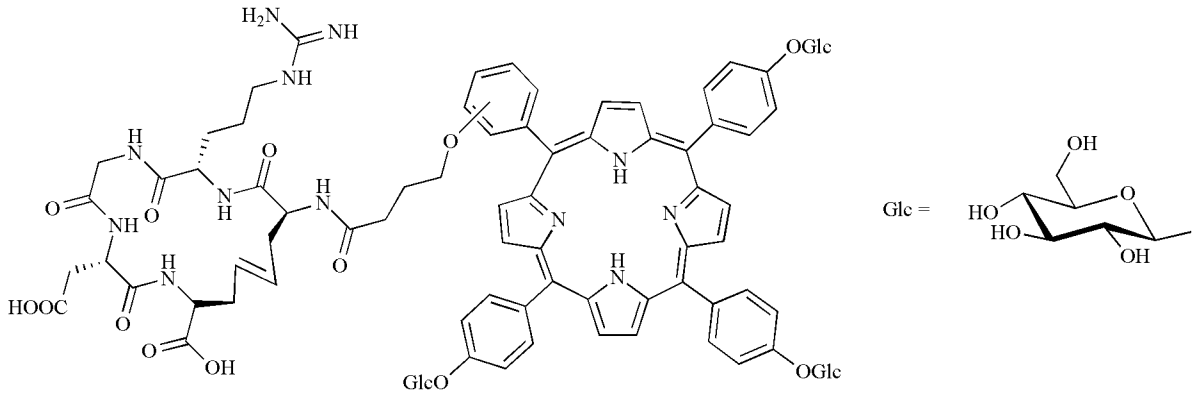


Fig. (9). Structure of the RGD-porphyrin conjugates prepared by *Chaleix et al.*

time. PDT with the conjugate showed angiographic closure of all treated choroidal neovascularization one day after treatment; the treatment was slightly less efficient with verteporfin-polyvinyl alcohol at the same drug dose (18/20). Noteworthy, treatment with the targeted verteporfin, on the contrary to treatment with verteporfin-polyvinyl alcohol, had minimal effect on retinal pigment epithelium and caused no injury to photoreceptors, arguing for the selectiveness of the treatment with this targeted photosensitizer.

Our group recently described the conjugation of the ATWLPPR peptide to 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin (TPC), *via* an aminohexanoic spacer (Fig. **10**) [47]. We showed, by ELISA assay, that ATWLPPR displaced the binding of the $VEGF_{165}$ isoform, not to KDR, as previously thought, but to its co-receptor NRP-1. Although coupling the peptide to the photosensitizer decreased its affinity for NRP-1 (IC_{50} = 171 µM *vs* 19 µM), the uptake of the TPC-aminohexanoic spacer-ATWLPPR conjugate and its photodynamic activity in human endothelial cells were significantly enhanced, compared to TPC (approximately 25- and 10- fold, respectively). Moreover, a pharmacokinetic study in nude mice xenografted with U87 human malignant glioma cells revealed relevant tumor levels of TPC-aminohexanoic spacer-ATWLPPR conjugate soon after intravenous injection. Finally, as U87 cells also express NRP-1 receptors, the conjugated photosensitizer could target not only angiogenic endothelial cells but also tumor cells. The photosensitizer-peptide conjugate was stable *in vivo* up to 2h after intravenous injection. After this time, the peptide moiety of the TPC-aminohexanoic spacer-ATWLPPR conjugate was progressively degraded, whereas the photoactivable moiety was left intact, as assessed by high performance liquid chromatography (HPLC) and MALDI-TOF mass spectrometry [60].

SYNTHETIC PEPTIDES USED AS NUCLEAR LOCALIZATION SIGNALS

Initial attempts to increase photosensitizers delivery focused on improving targeted to non-targeted tissue *ratios*. However, it was demonstrated that elevated tumor to normal tissue *ratios* did not ensure improved efficiency *in vivo* [61]. Photoactivated photosensitizer generates reactive oxygen species (singlet oxygen $^1O_2$, and free radicals such as $OH^{\cdot}$, $HO_2^{\cdot}$ and $O_2^{\cdot -}$ as well as H_2O_2), which are able to damage DNA, membranes, and other cell structure and macromolecules. It has been postulated that $^1O_2$ is the most important of these reactive species with a life span of 200 ns and a short migrating circumference about 45 nm. The site of $^1O_2$ production is therefore the site of photosensitization. The cell nucleus is the most sensitive site, in contrast to cell membranes and other cytoplasmic organelles [62]. Therefore, creation of a molecule of $^1O_2$ in close proximity to the cancer cell DNA would dramatically increase the odds of cell death whether by induction of apoptosis or by necrosis. None of the currently available photosensitizers is known to localize in the nucleus. Efforts have therefore been made to enhance delivery of the photosensitizer to the cell nucleus. Several peptide sequences have nuclear localizing properties. The entire transport into the nucleus, either passive or active, proceeds through the nuclear pore complex (NPC, Fig. **11**). In accordance with its name, NPC is a molecular sieve admitting free passive diffusion of proteins under 40-45 kDa, while larger proteins require a special addressing signal (amino-acid sequence); thus the proteins to be imported must have a nuclear localization signal (NLS) [63] or an analogous sequence. The proteins imported into the nucleus do not undergo proteolytic processing because, in contrast to the signals for targeting to the endoplasmic reticulum, mitochondria, peroxisome, etc., the NLS can be used repeatedly through a number of cell divisions, which involve dissolution of the nuclear envelope. Proteins are also able to be translocated to the nucleus in their native conformation without requirement of molecular chaperones / folding enzymes [64].

The process of NLS-mediated transport of proteins into the nucleus can be described in two basic steps (Fig. **11**). The first one involves an energy-independent recognition of the targeting signal of the transport substrate and docking at the NPC, while the second is energy-dependent, involving translocation through the pore. The first step is mediated by the "NLS receptor" the heterodimeric complex of the NLS-binding protein α-importin and nucleoporin-binding NPC docking protein β-importin, which is also required to enhance the affinity of α-importin-NLS binding [65]. The second step is mediated by an energy-dependent translocation of the importin complex with the NLS-carrying protein because the NPC requires a Ran protein in the GDP-carrying form and other proteins like RanGAP1 (Ran GTPase-Activating Protein 1), allowing Ran-GDP arising upon GTP hydrolysis by RanGAP1 to interact with β-importin. Thereby, the NLS-carrying protein and α-importin are released into the nucleo-

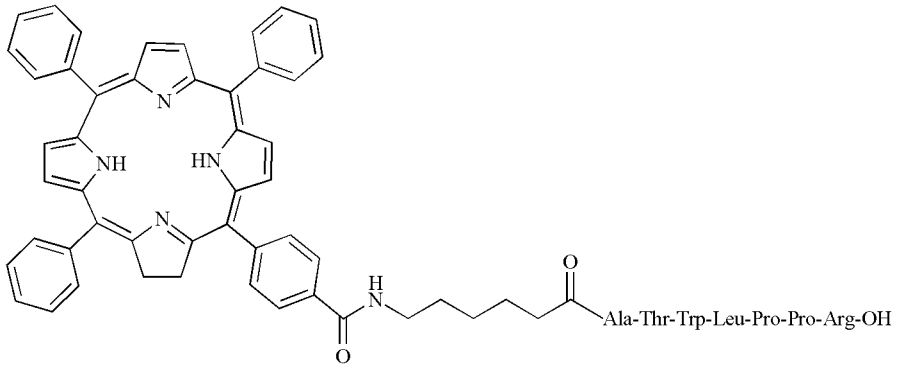


Fig. (10). ATWLPPR peptide conjugated with a chlorin prepared by Tirand *et al.*

Table 3. Photosensitizer-Peptide Conjugates

Homing peptide	Target	Photosensitizer	Linker	Ref.
Tumor cell surface				
H-pGlu-His-Trp-Ser-Tyr-[D-Lys]-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2 (GnRH agonist) or H-[D-pGlu]-[D-Phe]-[D- Trp]-Ser-Tyr-[D-Lys]-Leu-Arg-Pro-Gly-NH_2 (GnRH antagonist)	GnRH receptors	PpIX	ε-Lysine	[45]
H-Asp-Tyr-Met-Gly-Trp-Met-Asp-Phe-NH_2 (CCK8)	CCK_A	5,10,15-Tris(2,6-dichlorophenyl)-20-(4-carboxyphenyl)porphyrin (TDCMCPP-H_2) or TDCMCPP-In(III)	ε-Lysine	[46]
Tumor vasculature				
H-Arg-Gly-Asp-OH (RGD)	$\alpha_v\beta_3$-integrins	Tritolylporphyrins or triglucosylporphyrins	Butanoic acid	[48]
H-Gly-Arg-Gly-Asp-Gly-OH (cyclic peptide containing the RGD motif)	$\alpha_v\beta_3$-integrins	Triglucosylporphyrins	Butanoic acid	[49]
H-Ala-Pro-Arg-Pro-Gly-OH (APRPG)	Angiogenic endothelial cells	Verteporfin/ BPD-MA	PEG (2000)	[51]
H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH (ATWLPPR)	VEGFR-2/ KDR (according to [59])	Verteporfin/ BPD-MA	1,6-hexanediamine (between verteporfin and PVA) 3-mercapto-propionic acid (between ATWLPPR and PVA)	[50]
H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH (ATWLPPR)	NRP-1	5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin	Aminohexanoic acid	[47]

plasm while β-importin remains bound with NPC [66]. NLS-mediated transport of proteins into the nucleus is temperature- and energy-dependent and is suppressed by antibodies against the cytoplasm-soluble NPC components called the nucleoporins. The role of NLS resembles that of a ligand-receptor interaction: NLS is recognized, i.e., specifically bound by importins [63]. Several peptides sequences have nuclear localizing properties. Different NLS sequences have been tested to favor intranuclear delivery of photosensitizers into the target cells (Table **4**).

Ce6 displays low toxicity and preferential tumor localization [67-69]. The good results obtained with this chlorin has stimulated interest in the routing of Ce6 to the cytoplasm and nucleus of tumor cells [70]. Gariépy's group has designed branched peptides that act as multitasking intracellular vehicles [71-73]. These vehicles incorporate eight identical peptide arms coding for two functional domains, namely a pentalysine domain acting as a cytoplasmic transport sequence (CTS) and the simian virus SV40 large T antigen NLS which guide their nuclear uptake (Table **4**, Fig. **12**). These squid-like intracellular vehicles are referred to as loligomers.

By solid-phase synthesis, the coupling of Ce6 to a nucleus-directed linear peptide (Ce6-peptide, peptide: H-Ala-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Leu-Val-Glu-Asp-Pro-OH) or a branched peptide (Ce6-loligomer) composed of eight identical arms, displaying the sequence of the Ce6-peptide was achieved. The endocytosis and subsequent localization of these constructs within cell nuclei could be visualized using fluorescently tagged constructs with confocal microscopy and by following the migration of biotinylated constructs inside cells using electron microscopy. The time course and extent of intracellular accumulation of fluorescently tagged constructs were also assessed by flow cytometry. The authors have shown that cellular distributions of the two conjugates into radiation-induced fibrosarcoma cells (RIF-1) clearly differed. Nevertheless, an enhanced (1.5-fold) nuclear localization was only significant for Ce6-loligomer, compared to Ce6-peptide. Photodynamic activity of both conjugates against Chinese Hamster Ovary (CHO) cells was markedly increased compared to Ce6 (respectively 400 and 40 times higher for Ce6-loligomer and Ce6-peptide) but the phototoxicity was dependent on the cell line targeted (much better results were obtained with CHO than with RIF-1 cells, no details given). The mechanism of Ce6-loligomer-mediated toxicity was shown to involve the generation of reactive oxygen species, confirming that the activation of Ce6 is not hindered upon its attachment to the loligomer. Although it was clearly demonstrated that Ce6-loligomer reached the cytosol and accumulated in the nucleus, it remained unclear if the enhanced phototoxicity observed is predominantly due

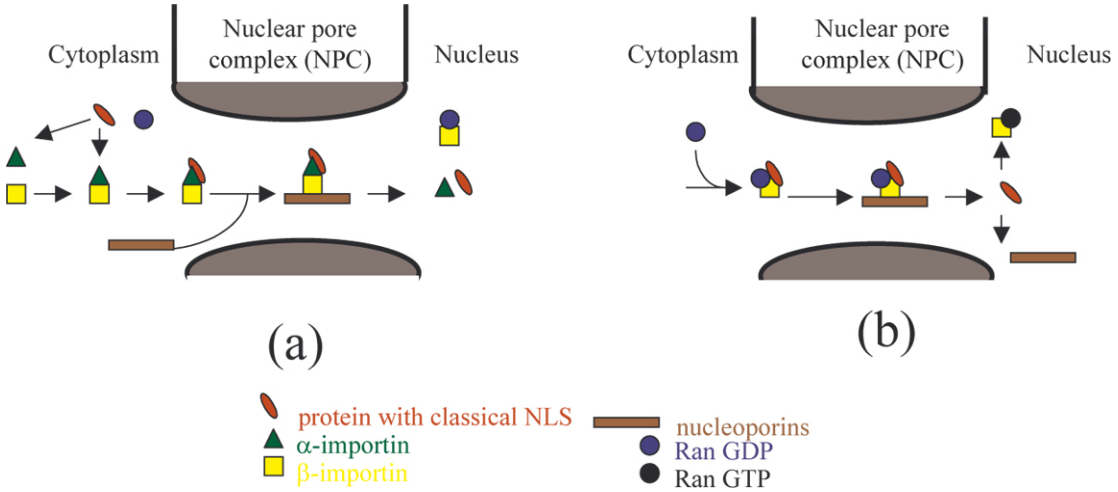


Fig. (11). Mechanisms of protein nuclear transport. (a) First step of proteins transport with classical NLS, involving the α/β-importin heterodimer (e.g., SV40 large T antigen); (b) second step-energy-dependent translocation of the importin complex with the NLS-carrying protein toward the nucleoplasm, requiring a Ran protein mostly in the GDP form in the cytoplasm and in the GTP form in the nucleus.

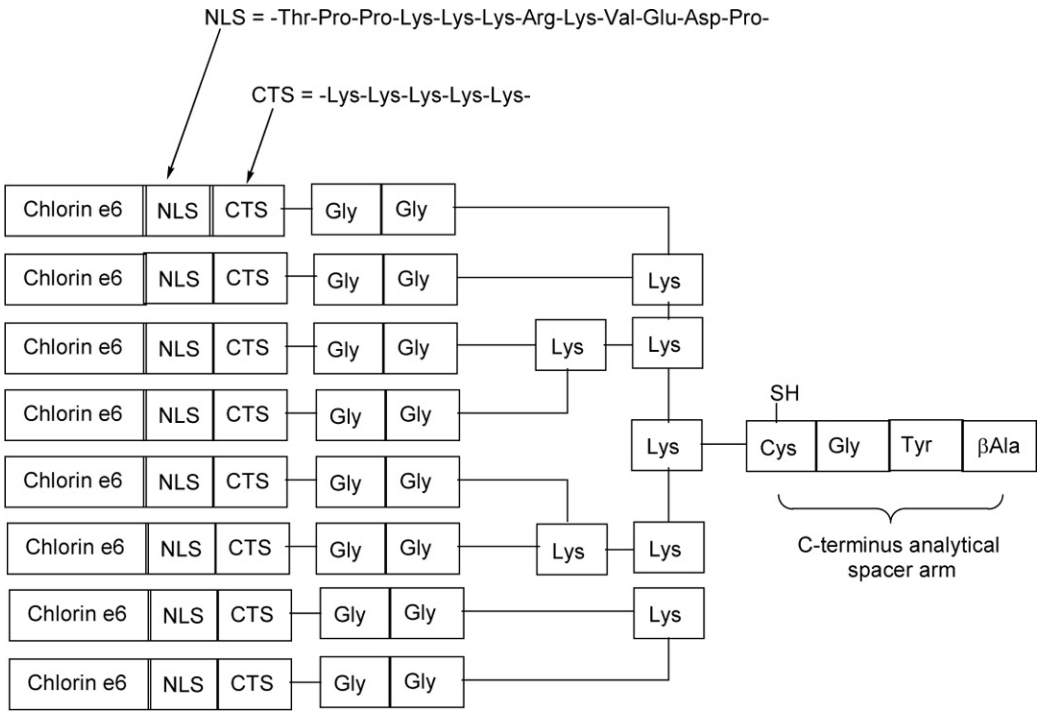


Fig. (12). Structure of a loligomer used by Sobolev *et al.*

to $^1O_2$ events occurring in the nucleus of cells as a result of nuclear localization, or a simple consequence of the improvement of Ce6 uptake in relation with the peptide construct. Thus, results obtained by Gariépy *et al.* clearly demonstrated that the incorporation of Ce6 into peptide-based intracellular vehicles enhanced its phototoxicity and this approach highlights the utility of designing peptides as vehicles for regulating the intracellular distribution of photosensitizers such as Ce6 in order to maximize their efficacy in PDT.

According to initial observations, Ce6 has a significantly higher photosensitizing activity when present in conjugates containing specific ligands such as insulin or concanavalin A and, is thus able to be internalized by receptor-expressing cells [74-76]. These conjugates were able to be endocytosed by the receptor-expressing cells and transported into specific cellular compartments: lysosomes, in the case of concanavalin-A-Ce6 conjugates, and near and within the cell nucleus for bovine serum albumin (BSA)-Ce6-insulin conjugates [76]. The photodynamic action of BSA-Ce6-insulin was

higher (selective photodamage near the nucleus) than the concavalin-A-Ce6 conjugate (selective photodamage of lysosomes), while the photodynamic action of both was higher than that of free Ce6 (photodamage of peripheral membranes). Photodynamic action could be competed by an excess of free ligand, indicating that uptake and photosensitization were receptor-specific, while prevention of endocytosis through incubation with conjugates at low temperature reduced photosensitization.

With the goal to enhance the photodynamic activity of Ce6 by the directed delivery of photosensitizers, Sobolev *et al.* have also shown that photosensitizers can be successfully redirected within cells by using cross-linked modular polypeptide transporters possessing (Fig. **13**):

(i) an internalizable ligand providing a cell-specific delivery;

(ii) a module enabling escape from endosomes;

(iii) a nuclear localization sequence (NLS) conferring interaction with importins, the cellular proteins mediating active translocation into the nucleus (Fig. **11**);

(iv) and a module allowing attachment of the photosensitizer [77].

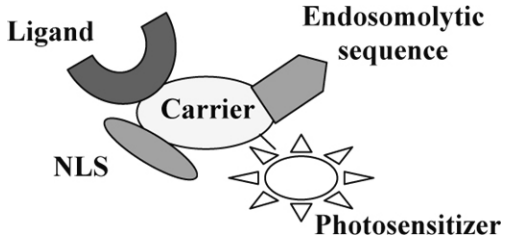


Fig. (13). Scheme of distinct modules conferring cell-specific targeting for photosensitizers. The various sequence modules for cell surface binding and uptake (a ligand), an endosomolytic sequence, and a NLS as well as the photosensitizer, are linked to the carrier molecule.

Lysosomes are the final destination for many macromolecules like photosensitizers taken up by endocytosis from the cell surface. To target the nucleus, ligands need to either circumvent the lysosomal uptake or favor an escape from endosomes. Thus, variegated approaches have been undertaken to expedite intra-cellular delivery prior to lysosomal trafficking. Endolysosomal escape may be exemplified by endosomolytic peptides.

To enhance the photosensitization effected by these conjugates, Sobolev *et al.* linked variants of the SV40 large tumor antigen NLS to target Ce6 to the nucleus [78].

They set out to compare the photodynamic activity of conjugates without or with the T antigen NLS (amino-acids 126-132) together with the T antigen N-terminal flanking sequence (amino-acids 111-125) which have been shown to enhance T antigen nuclear transport. The authors have demonstrated that the casein-kinase II phosphorylation site (Ser 112) within this flanking region increased the rate of T antigen nuclear import, while phosphorylation by the cyclin-dependent kinase *cdc2* at another site (Thr 124) reduced the maximal level of transport by about 70%. This enabled the authors to design an NLS optimized for efficient nuclear targeting (P101Lys), spanning T antigen amino-acids 111-132, including the casein-kinase II site, but lacking the cyclin-dependent kinase site (see Table **4**). BSA or β-galactosidase / β-galactosidase fusion protein were used as carriers to which insulin, Ce6 and the NLS were included either as peptides covalently coupled to BSA or within the coding sequence of P10 (NLS-containing β-galactosidase fusion protein, see Table **4**). P10 containing the casein-kinase II site enhanced the rate of nuclear import by about 50-fold. The most efficient photosensitizing agent was found to be the P10-Ce6-insulin adduct. This conjugate exhibited an IC_{50} value of 0.13 nM, compared to 2 nM for the NLS-deficient β-galactosidase-Ce6-insuline conjugate, which is over 2400 times lower than the value for the free Ce6. Subsequent work of this group demonstrated that co-incubation of cells with human adenovirus serotype 5 synergized with NLS containing P10-Ce6-insulin conjugate. The innovation of this concept was to include with the conjugate, attenuated adenoviruses which possess endosomolytic function. The nuclear photosensitizing activity was found higher than in the cytoplasm by 2.5-fold [79]. This original targeting strategy demonstrated that the use of adenoviruses in conjunction with nuclear-targeting photosensitizers could have interesting implications for achieving efficient cell-type-specific PDT.

In a similar fashion to insulin (Fig. **11**), hemoglobin-like protein of *Escherichia coli* was used as a carrier module for photosensitizer targeting to the cell nuclei of mouse cells [80]. Because α-melanocytes stimulating hormone receptors are over-expressed in many melanomas [81-83], the synthesis of modular recombinant transporters which contain:

(i) the ligand module, melanocyte-stimulating hormone (MSH);

(ii) the optimized SV40 virus large T-antigen, containing the following amino-acid sequence : H-Ser-Ser^{112}-Asp-Asp-Glu-Ala-Trp-Ala-Asp-Ala-Gln-His-Ala-Ala^{124}-Pro-Pro-Lys-Lys^{128}-Lys-Arg-Lys-Val-Glu-Asp-Pro^{135}-OH, which serves as a nuclear localization signal. Ser^{112} is the phosphorylation site for protein kinase CKII and accelerates the T antigen nuclear import;

(iii) hemoglobin-like protein of *Escherichia coli*, and

(iv) an endosomolytic module, amphipatic poly(oligo)peptide was developed.

Results obtained showed that the half-maximum effect concentration of bacteriochlorin p_6 conjugated with the MRT on the mouse melanoma B16-F1 cells was about 250-fold lower than that of the free photosensitizer. No cell damage was observed for the conjugate when tested on normal mouse fibroblasts at the concentrations efficient on the melanoma cells, which confirms the cell specificity.

Finally, with the goal to simplify the preparation of the multi-component transporters, Sobolev *et al.* have recently succeeded in producing bacterially-expressed, modular recombinant polypeptide vehicles for photosensitizers. Evaluation of the photocytotoxic effect on B16-F1 cells showed that the efficacy of bacteriochlorin p_6 was enhanced by a factor of 230 by attachment to modular recombinant transporters. The cell-specific activity of the conjugates was also

demonstrated [84]. The PS-MRT conjugate lacking the NLS module showed lower phototoxic activity than the conjugates described above. Problems may however reside in the potential antigenicity of the addressed delivery constructs in the organism.

The modular vehicles, widely developed by Sobolev *et al*., able to reach predetermined compartments of the target cells and thereby potentiating the action of the drugs, constitute a real new generation of broad purpose pharmacological agents. However, there are several drawbacks to the use of such high molecular weight constructs. Despite the improvement of cell selectivity, the main critic is the technological feasibility to produce such modular polypeptide transporters. Multi-component transporters are produced in a laborious and expensive fashion through covalent linkages of different peptide modules *via* bifunctional cross-linking reagents. Even if they prove to be highly efficient *in vivo*, such macromolecules are unlikely to find broad clinical applications. For this purpose, simpler carriers possessing the ability to associate themselves with some tumor specific entities are required.

Walker *et al.* have demonstrated that the linear peptide sequence H-Gly-Gly-Val-Lys-Arg-Lys-Lys-Lys-Pro-Gly-Tyr-Gly-OH derived from the T antigen of the SV40 virus, a characteristic nuclear sequence, can be attached to purpurin-18 in a one to one ratio (Fig. **14**). No discernable decrease in the *in vitro* photodynamic activity was observed for the conjugate compared to purpurin-18 [85].

A second example of a porphyrin-NLS conjugate in which the peptide NLS is directly bound to the porphyrin was very recently reported by Dozzo *et al.* [86]. The boronated porphyrin derived from protoporphyrin IX dimethyl ester was coupled to the SV40 large T antigen NLS H-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-OH containing basic charged amino-acids to enhance the aqueous solubility of the conjugate. A simple glycine was added to the amino terminus to act as a spacer between the porphyrin and the peptide (Fig. **15**). The non-covalent association of the conjugate with low density lipoproteins (LDL) was demonstrated. The model proposed suggested that the hydrophobic portion of the molecule interacted with the cholesterol ester-rich interior of the LDL particle, while the hydrophilic end remained

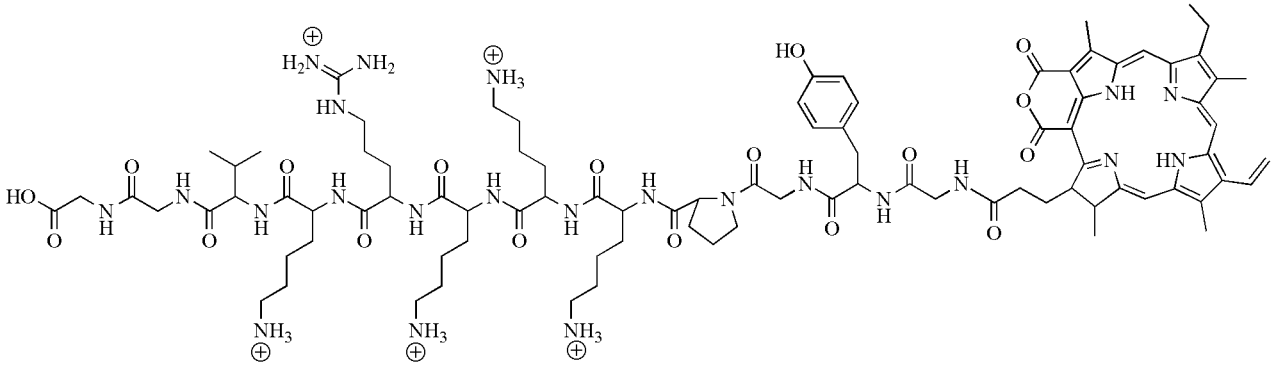


Fig. (14). Structure of the H-Gly-Gly-Val-Lys-Arg-Lys-Lys-Lys-Pro-Gly-Tyr-Gly-OH-purpurin-18 conjugate.

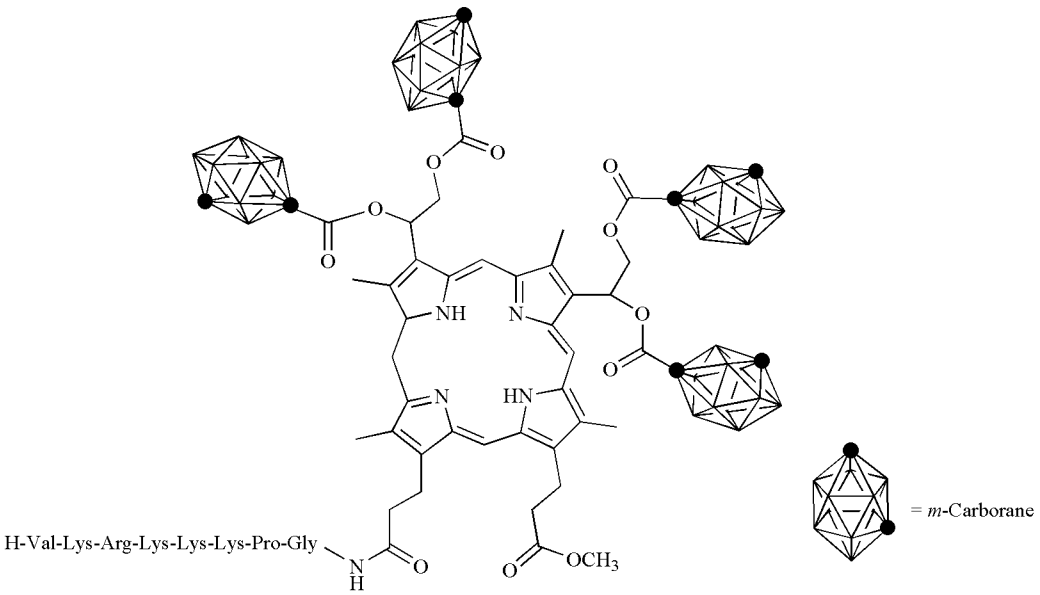


Fig. (15). Structure of the boronated porphyrin-NLS conjugate prepared by Dozzo *et al.*

through the phospholipidic bilayer. Since the LDL receptor is up-regulated in many tumors including gliomas [87], the porphyrin-NLS-LDL association is expected to provide a new and selective entry pathway into malignant cells over-expressing the LDL receptor.

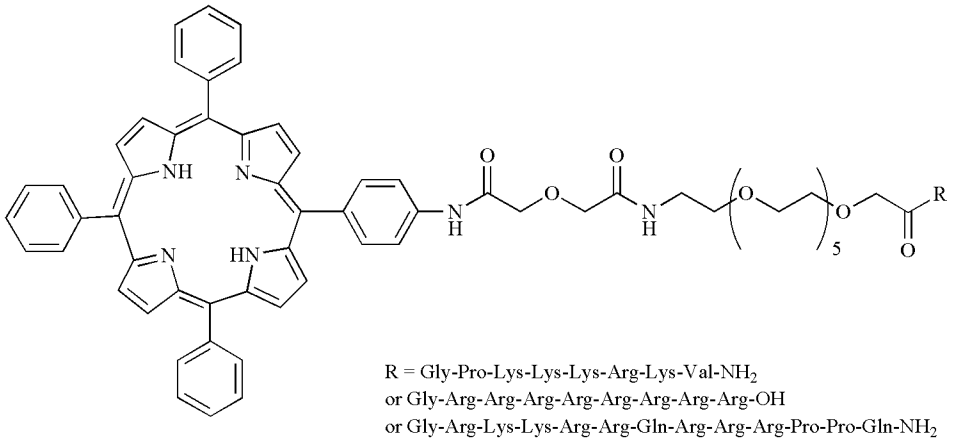
Very recently, Sibrian-Vazquez *et al.* found that the sub-cellular distribution of porphyrin-peptide conjugates was also dependent on the nature of the substituents on the porphyrin macrocycle [88].

Three series of conjugates were prepared (Fig. **16**):

- porphyrins linked to the NLS of the SV40 large T antigen, H-Gly-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-NH_2;
- porphyrins linked to the membrane translocation peptide HIV-1 Tat 48-60, H-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln-NH_2;
- porphyrins linked to an octamer of arginine H-Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-OH which enhances the cellular uptake.

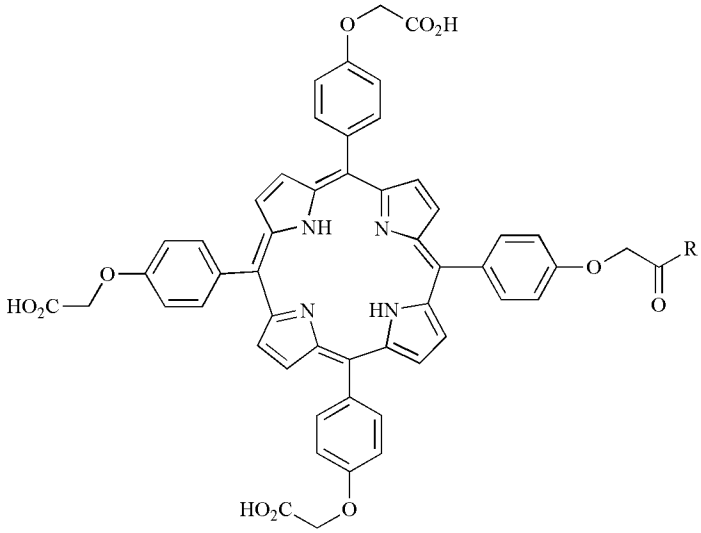
Low molecular weight PEGs were used to link the porphyrin and the peptide moieties in order to enhance the water solubility of the conjugates and to minimize interactions and aggregation in aqueous solution.

Results obtained showed that the fusogenic sequences HIV-1 Tat 48-60 and *octa*-arginine were the most effective



R = Gly-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-NH_2
or Gly-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-Arg-OH
or Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln-NH_2

Class I conjugates



R = $NH(CH_2CH_2O)_7CH_2CH_2NHCOCH_2OCH_2CO$-Gly-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-H
or $NH(CH_2CH_2O)_7CH_2CH_2NHCOCH_2OCH_2CO$-Gly-Arg-Lys-Lys-Arg-Arg-Gln-Arg-Arg-Arg-Pro-Pro-Gln-H

Class II conjugates

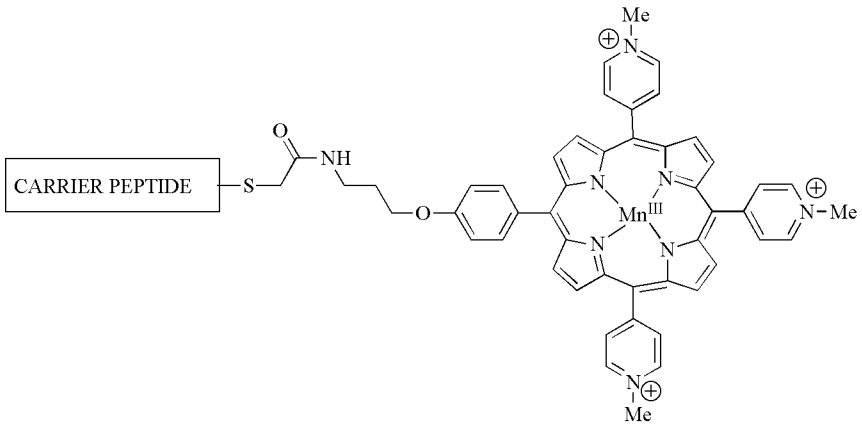
Fig. (16). Peptides functionalized porphyrins prepared by Sibrian-Vazquez *et al.*

in delivering the conjugate to the cells. Moreover, class I conjugates were taken up by cells to a higher extent than compounds of class II and localized preferentially in the endoplasmic reticulum, while class II conjugates were mainly found in the lysosomes. Phototoxicity, evaluated in human HEp2 cells, showed that class I conjugates, bearing a hydrophobic porphyrin, were significantly more efficient than the class II carboxylic functionalized porphyrin conjugates. Among class I conjugates, the most phototoxic compound was the one bearing the NLS peptide (IC_{50} = 1.5 μM).

Peptide-assisted internalization of porphyrins has also been demonstrated by Chaloin *et al*. [89]. The carrier chosen belongs to the peptide signal-nuclear localization sequence family [90]. This peptide family is based on the juxtaposition of two types of sequences, a signal peptide and a nuclear localization sequence. The combination of these two sequences gives a peptide possessing an amphipathic character. The authors have shown that the peptide Ac-Met-Gly-Leu-Gly-Leu-His-Leu-Leu-Val-Leu-Ala-Ala-Ala-Leu-Gln-Gly-Ala-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-Cya (Ac and Cya are acetyl and cysteamide groups respectively), where the hydrophobic and hydrophilic domains correspond to a signal peptide and a nuclear localization sequence, respectively, can significantly improve cellular internalization of Mn(+3)-*meso*-tetrakis(4-*N*-methylpyridinium)porphyrin pentaacetate (Mn-TMPyP) and of its metal free derivative (Fig. **17**). The Mn (+3) porphyrin-peptide conjugate was internalized by fibroblasts and lymphocytic cells (L1210) in 80% yield after 5 min incubation with the final localization being mainly nuclear. When the naked porphyrin was used, only about 3% of the cells indicated a porphyrin uptake with a cytoplasmic localization after 2h incubation. Although the metalloporphyrin-peptide conjugate was not developed for PDT, it was able to cleave *in vitro* high and low molecular weight DNA to the same extent as the metalloporphyrin alone without affecting the sequence-specific cleaving activity of the porphyrin. The conjugate was found to be 100-fold more efficient at inducing tumor cells death than the free metalloporphyrin *via* a mechanism involving genomic DNA cleavage.

A very recent study of Rozenzhak *et al.* has shown that nuclear targeting of streptavidin functionalized semiconductor quantum dots, CdSe@ZnS, could be achieved with the nuclear localization sequence of the SV40 T-antigen [91]. The NLS peptide Biotin-Lys-Gly-Gly-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-OH was conjugated to the quantum dots *via* the biotin-streptavidin linkage. A second peptide named Pep-1 (H-Lys-Glu-Thr-Trp-Trp-Glu-Thr-Trp-Trp-Thr-Glu-Trp-Ser-Gln-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-OH), extremely efficient in the targeting of proteins into cells, independent of endocytosis [92], but not covalently coupled to the cargo that it ferries across the cell membrane, was also used to facilitate the uptake of quantum dots into mammalian cells (Fig. **18**).

When NLS-conjugated quantum dots were pre-incubated with Pep-1 peptide and then introduced to ovarian carcinoma



CARRIER PEPTIDE = Ac-Met-Gly-Leu-Gly-Leu-His-Leu-Leu-Val-Leu^{10}-Ala-Ala-Ala-Leu-Gln-Gly-Ala-Lys-Lys-Lys^{20}-Arg-Lys-Val-Cya

Fig. (17). Structure of the carrier peptide-porphyrin conjugate prepared by Chaloin *et al.*

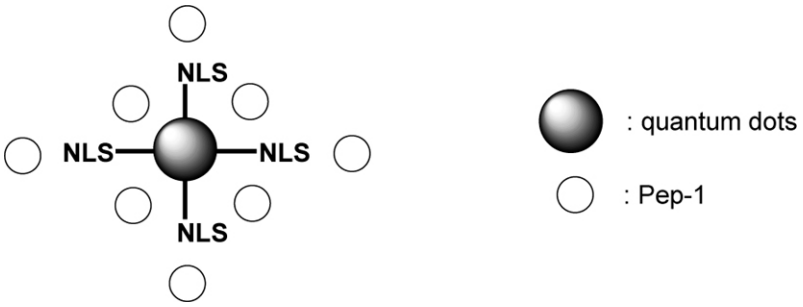


Fig. (18). Schematic representation of the SV40 T-antigen NLS functionalized quantum dots.

Table 4. Amino-Acids Sequences of the NLS-Peptides Used

NLS-peptides sequences used	Ref.
Residues 124-135 of the SV40 large T antigen with a Thr to Ala substitution at position 124 H-Ala-Pro-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-Glu-Asp-Pro-OH	[70]
Residues 126-132 of the SV40-large-tumor antigen **P101Lys:** H-Cys-Gly-Pro-Gly-Ser^{112}-Asp-Asp-Glu-Ala-Ala-Ala-Asp-Ala-Gln-His-Ala-Ala^{124}-Pro-Pro-Lys-Lys^{128}-Lys-Arg-Lys-Val^{132}-Gly-Tyr-OH **P101Thr:** H-Cys-Gly-Pro-Gly-Ser^{112}-Asp-Asp-Glu-Ala-Ala-Ala-Asp-Ala-Gln-His-Ala-Ala^{124}-Pro-Pro-Lys-Thr^{128}-Lys-Arg-Lys-Val^{132}-Gly-Tyr-OH **P10:** Includes T antigen amino-acids 111-135: H-Ser-Ser^{112}-Asp-Asp-Glu-Ala-Thr-Ala-Asp-Ala-Gln-His-Ala-Ala^{124}-Pro-Pro-Lys-Lys^{128}- Lys-Arg-Lys-Val-Glu-Asp-Pro^{135}- OH Ser^{112} is the site of CKII phosphorylation which enhances T-antigen nuclear import Thr^{124} substituted by Ala is the site of phosphorylation by *cdc*2 which inhibits T-antigen nuclear import Substitution of Lys^{128} by Thr abolishes NLS activity	[79]
Primary amphipathic peptide where the hydrophobic and the hydrophilic domains correspond to a signal peptide and a NLS Ac-Met-Gly-Leu-Gly-Leu-His-Leu-Leu-Val-Leu-Ala-Ala-Ala-Leu-Gln-Gly-Ala-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-Cya (where Ac and Cya are acetyl and cysteamide groups, respectively.)	[89]
Peptide sequence from the T-antigen of the SV40 virus H-Gly-Gly-Val-Lys-Arg-Lys-Lys-Lys-Pro-Gly-Tyr-Gly-OH	[85]
From the T-antigen of the SV40 virus H-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-OH	[86]
From the T-antigen of the SV40 virus Biotin-Lys-Gly-Gly-Pro-Lys-Lys-Lys-Arg-Lys-Val-OH	[91]

cells (HeLa), the nuclear localization of the NLS-quantum dots was observed in a great number of cells (data not given) while quantum dots not conjugated to the NLS peptide were incorporated in only a small percentage of cells (less than 10%). Due to the size-tunable narrow emission, photostability and high luminescence of semiconductor quantum dots [93], we believe that the pioneer work of Rozenzhak *et al.* gives not only an insight into the potential of quantum dots as robust fluorescent probes but should also find applications in nuclear targeted PDT.

SPECIFIC PEPTIDES AS BIODEGRADABLE SUBSTRATES

In most studies, it is important that the peptide used as a vector remains stable. Nevertheless, in some cases, peptides sequences can be used as specific cleavable or biodegradable compounds for cellular peptidases.

A very elegant approach was realized by Chen *et al.* who combined a photosensitizer and a $^1O_2$ scavenger, linked together by a specific target peptide [94]. The short peptide sequence H-Gly-Asp-Glu-Val-Asp-Gly-Ser-Gly-Lys-OH is specific to a caspase-3 protease that is expressed in cancer cells. Pyropheophorbide *a* was used as the photosensitizer and a carotenoid as the quencher, since it is known to quench triplet excited states and also to scavenge $^1O_2$ [95] (Fig. **19**).

The authors proved by HPLC that addition of caspase-3 induced cleavage of the peptide and was specific by using a caspase-3 specific inhibitor that completely blocked the enzyme activity [96]. $^1O_2$ was inhibited by the quencher and the cleavage due to caspase-3 induced the separation of the scavenger and the pyropheophorbide *a*, leading to photoactivation of the latter. The authors plan to test this strategy in a near future on cancer cells *in vitro* and *in vivo* with a tumor-specific peptide linker [97].

Another example of active targeting was described by Berger *et al.* [98] who coupled ALA to short peptides, to specifically target ALA to endothelial or tumor cells. They synthesized and studied ALA derivatives containing basic, acidic and neutral amino-acids that represent potential substrates for cell surface and cytoplasmic aminopeptidases and/or ligand for peptide and amino-acid transporters (Table **5**). Indeed, they previously showed that aminopeptidase activities are different between tumor and normal vasculature of the same organ [99]. Production of PpIX was compared in endothelial (HCEC and EC219) and carcinoma (A549) cell lines, expressing high or low levels of three different types of aminopeptidases being acid, basic or neutral.

Substrates for basic aminopeptidases were not precursors for protoporphyrin IX production, while substrates for acidic aminopeptidases were precursors only in cells expressing acid activity, with a high concentration of pro-drug (up to 10 mM). With all the cells lines tested, the best precursors were the neutral aromatic amino substrates H-Phe-ALA-OMe and H-ala-ALA-OMe for neutral aminopeptidases. The authors proved the feasibility of targeting the production of protoporphyrin IX using peptide derivatives of ALA for cellular peptidases.

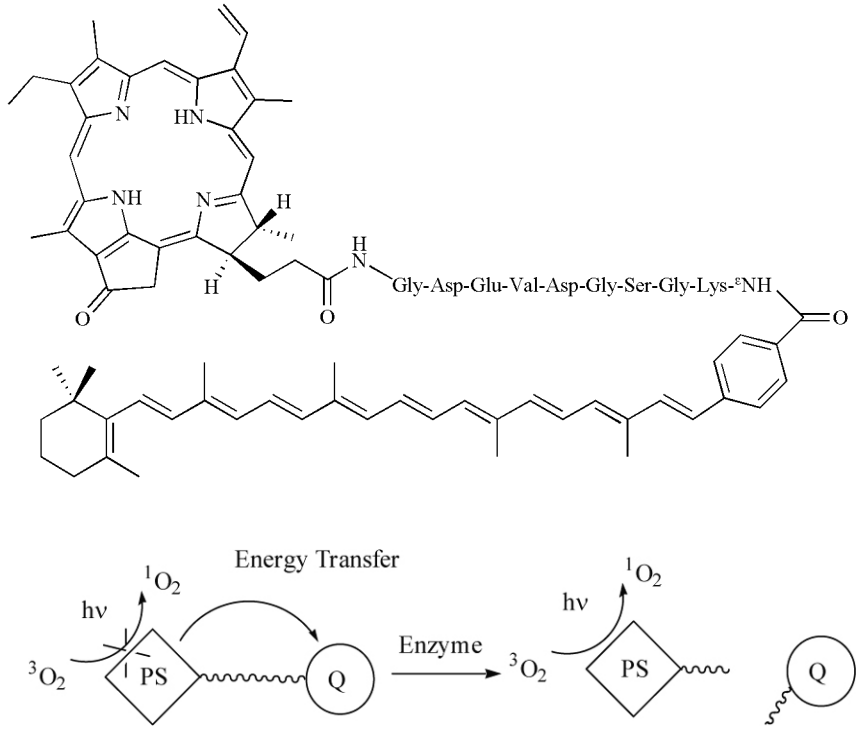


Fig. (19). Concept of $^1O_2$ quenching/scavenging and activation. PS : photosensitizer, Q: quencher.

The same group also investigated dipeptide ALA-derivatives [100]. Potential substrates for pro-specific peptidases (for dipeptidyl-aminopeptidase IV (DPPIV /CD26) activity, prolyl-oligopeptidase, neutral endopeptidase 24.11/NEP/ CD10/neprilyiyn) were evaluated. The authors showed that Gly/Pro-containing dipeptide-ALA derivatives were internalized and hydrolyzed by intracellular proteases, belonging to the classes of Ser-proteases and/or metalloproteases. This work is the first report of Boc-Gly-Gly-X sensitivity to hydrolysis. Rogers *et al.* [101] synthesized peptide-ALA derivatives to target cancer cells since the release of ALA once incorporated is mediated by intracellular peptidase and esterase activities. Among the substrates prepared, two of them incorporating a dipeptide fragment Phe-Lys have been studied, since Ac-Phe-Lys has already been used to create lysosomally cleavable prodrugs of doxorubicin [102]. The authors developed an efficient synthesis strategy of 5-ALA conjugated to peptides that overcome the known instability of the amino acid under basic conditions and new 5-ALA prodrug derivatives will be elaborated. No biological studies have been performed yet.

CONCLUSION

This review highlights the recent diverse strategies developed to achieve specific photosensitizer targeting by synthetic peptides. During the last five years, a large number of cell-binding peptides have been identified. However, only a few homing peptides coupled to photosensitizers have been tested *in vivo* for PDT treatment. This could be due to the inherent enzymatic instability of unmodified peptides. In return, peptides are usually less toxic, more soluble and easier to identify and synthesize than small targeting organic molecules. In order to be used as efficient homing peptides, they have to be chemically modified. In this respect, the use of D-amino-acids, pseudo amino-acids and peptide cyclization are the most common strategies to increase peptide stability.

Photosensitizers used for PDT have an important tendency to aggregate by virtue of their large planar aromatic ring systems, leading to interactions between the photosensitizer molecules (hydrophobic interactions between the aromatic core of the photosensitizers), and non-covalent complexes with proteins and lipoproteins [103]. The presence of non-covalently bound photosensitizers will also affect the biological effects, making the comparison of results difficult and evaluation of the targeting moiety questionable. Furthermore, it is necessary not only to consider delivery of the photosensitizer to the target cell but also to get efficient accumulation of the photosensitizer at sensitive subcellular localizations, e.g. the nucleus. Actually, photosensitizer accumulation in cells within endosomes and lysosomes may be less effective than the corresponding non-conjugated photosensitizer despite increased intracellular uptake.

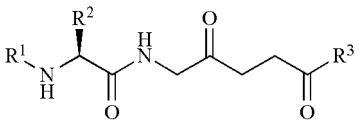
In order for PDT to reach its full potential, there will be a need for varied photosensitizers and numerous targeting motifs so that all cells and tissue types can be selectively destroyed.

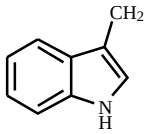
ABBREVIATIONS

ALA	=	Aminolevulinic acid
AP	=	Aminopeptidase
BPD-MA	=	Benzoporphyrin derivative monoacid ring A

Schneider et al.

le 5. ALA Derivatives Prepared by Berger *et al.*



R^1	R^2	R^3	Compound
Boc	CH_3	CH_3	Boc-Ala-ALA-OMe
TFA,H_2	CH_3	CH_3	H-Ala-ALA-OMe
TFA,H_2	CH_3	$(CH_2)_5CH_3$	H-Ala-ALA-O$(CH_2)_5CH_3$
TFA,H_2	Benzyl	CH_3	H-Phe-ALA-OMe
TFA,H_2	$(CH_2)_4$-NH_3,TFA	CH_3	H-Lys-ALA-OMe
TFA,H_2	CH_2-COOH	CH_3	H-Asp-ALA-OMe
Boc	CH_3	H	Boc-Ala-ALA
TFA, H_2	CH_3	H	H-Ala-ALA
Boc-Gly	H	Et	Boc-Gly-Gly-ALA-OEt
Gly	H	Et	Gly-Gly-ALA-OEt
Boc-Gly	*c*-$(CH_2)_4$	Et	Boc-Gly-Pro-ALA-OEt
Gly	*c*-$(CH_2)_4$	Et	Gly-Pro-ALA-OEt
Boc-Gly	H	$O(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_3$	Boc-Gly-Gly-ALA-$O(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_3$
Gly	H	$O(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_3$	Gly-Gly-ALA- $O(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_3$
Boc-Gly-Gly	H	$O(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_3$	Boc-Gly-Gly-Gly-ALA- $O(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_3$
Gly-Gly	H	$O(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_3$	Gly- Gly-Gly-ALA- $O(CH_2CH_2O)_2CH_2CH_3$
Boc-Gly	H	Me	Boc-Gly-Gly-ALA-OMe
Boc-Gly-Gly	H	Me	Boc-Gly-Gly-Gly-OMe
Gly-Gly	H	Me	Gly-Gly-Gly-ALA-OMe
Z-Leu		Me	Z-Leu-Trp-ALA-OMe

BSA = Bovine serum albumin
CCK8 = Peptide hormone cholecystokinin
Cdc2 = Cyclin-dependent kinase (cdk) *cdc*2
Ce6 = Chlorin e6
CKII = Casein-kinase II
CTS = Cytoplasmic transport sequence
DNA = Deoxyribonucleic acid
ELISA = Enzyme linked immunosorbent assay
GDP = Guanosine-5'-diphosphate
GnRH = Gonadotropin-releasing hormone
GTP = Guanosine-5'-triphosphate
HPLC = High performance liquid chromatography
IC = Inhibition concentration
KDR = Kinase domain receptor
LDL = Low density lipoprotein
LDLR = Low density lipoprotein receptor
mALA = Methyl aminolevulinate
MoAb = Monoclonal antibody
MALDI-TOF= Matrix assisted laser desorption ionization-time of flight
Mn-TMPyP = Mn(+3)-*meso*-tetrakis(4-*N*-methyl-pyridinium)porphyrin pentaacetate
MRT = Modular recombinant transporter
MSH = Melanocyte-stimulating hormone
m-THPC = meta-tetrahydroxyphenyl chlorin
NLS = Nuclear localization signal
NPC = Nuclear pore complex
NRP = Neuropilin
PEG = Polyethylene glycol
PDT = Photodynamic therapy

PK	=	5,10,15-tris(2,6-dichlorophenyl)-20-(4-carboxyphenyl)porphyrin
PpIX	=	Protoporphyrin IX
PS	=	Photosensitizer
SV	=	Simian virus
T-ag	=	T-antigen
TPC	=	5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin
TSPc	=	Zinc phthatocyanine tetra-sulphonic acid
VEGF	=	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	=	VEGF receptor

REFERENCES

[1] Radu, A.; Wagnieres, G.; van den Bergh, H.; Monnier, P. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* **2000,** *10*, 439-60.
[2] Metz, J. M.; Friedberg, J. S. *Chest. Surg. Clin. N. Am.* **2001,** *11*, 829-39.
[3] Savary, J. F.; Monnier, P.; Fontolliet, C.; Mizeret, J.; Wagnieres, G.; Braichotte, D.; van den Bergh, H. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **1997,** *123*, 162-8.
[4] Guillemin, F.; Cosserat-Gerardin, I.; Notter, D.; Vigneron, C. *Pathol. Biol. (Paris)* **2001,** *49*, 815-23.
[5] Jichlinski, P.; Leisinger, H. J. *Urol. Res.* **2001,** *29*, 396-405.
[6] Brown, S. B.; Mellish, K. J. *Expert. Opin. Pharmacother.* **2001,** *2*, 351-61.
[7] Fritsch, C.; Goerz, G.; Ruzicka, T. *Arch. Dermatol.* **1998,** *134*, 207-14.
[8] Karrer, S.; Szeimies, R. M.; Hohenleutner, U.; Landthaler, M. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2001,** *2*, 229-37.
[9] Moriwaki, S. I.; Misawa, J.; Yoshinari, Y.; Yamada, I.; Takigawa, M.; Tokura, Y. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.* **2001,** *17*, 241-3.
[10] Gilson, D.; Ash, D.; Driver, I.; Feather, J. W.; Brown, S. *Br. J. Cancer* **1988,** *58*, 665-7.
[11] Sharman, W. M.; Allen, C. M.; van Lier, J. E. *Drug Discov. Today* **1999,** *4*, 507-517.
[12] Azab, M.; Boyer, D. S.; Bressler, N. M.; Bressler, S. B.; Cihelkova, I.; Hao, Y.; Immonen, I.; Lim, J. I.; Menchini, U.; Naor, J.; Potter, M. J.; Reaves, A.; Rosenfeld, P. J.; Slakter, J. S.; Soucek, P.; Strong, H. A.; Wenkstern, A.; Su, X. Y.; Yang, Y. C. *Arch. Ophthalmol.* **2005,** *123*, 448-57.
[13] Brown, S. B.; Brown, E. A.; Walker, I. *Lancet Oncol.* **2004,** *5*, 497-508.
[14] Budzinskaia, M. V.; Likhvantseva, V. G.; Shevchik, S. A.; Loshchenov, V. B.; Kuz'min, S. G.; Vorozhtsov, G. N. *Vestn. Oftalmol.* **2005,** *121*, 13-6.
[15] Barrett, A. J.; Kennedy, J. C.; Jones, R. A.; Nadeau, P.; Pottier, R. H. *J. Photochem. Photobiol. B* **1990,** *6*, 309-23.
[16] Dougherty, T. J.; Gomer, C. J.; Henderson, B. W.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, M.; Moan, J.; Peng, Q. *J. Natl. Cancer Inst.* **1998,** *90*, 889-905.
[17] Reddi, E. *J. Photochem. Photobiol. B* **1997,** *37*, 189-95.
[18] Vrouenraets, M. B.; Visser, G. W.; Loup, C.; Meunier, B.; Stigter, M.; Oppelaar, H.; Stewart, F. A.; Snow, G. B.; van Dongen, G. A. *Int. J. Cancer* **2000,** *88*, 108-14.
[19] Vrouenraets, M. B.; Visser, G. W.; Stigter, M.; Oppelaar, H.; Snow, G. B.; van Dongen, G. A. *Cancer Res.* **2001,** *61*, 1970-5.
[20] Vrouenraets, M. B.; Visser, G. W.; Stigter, M.; Oppelaar, H.; Snow, G. B.; van Dongen, G. A. *Int. J. Cancer* **2002,** *98*, 793-8.
[21] Klyashchitsky, B. A.; Nechaeva, I. S.; Ponomaryov, G. V. *J. Control. Release* **1994,** *29*, 1-16.
[22] Krinick, N. L.; Kopecek, J. in *Targeted Drug Delivery*, R.L. Juliano ed.; Springer: Berlin, **1991**.
[23] Illum, L.; Jones, P. D. *Methods Enzymol.* **1985,** *112*, 67-84.
[24] Aina, O. H.; Sroka, T. C.; Chen, M. L.; Lam, K. S. *Biopolymers* **2002,** *66*, 184-99.
[25] Sharman, W. M.; van Lier, J. E.; Allen, C. M. *Adv. Drug. Deliv. Rev.* **2004,** *56*, 53-76.
[26] Lombardi, A.; Nastri, F.; Pavone, V. *Chem. Rev.* **2001,** *101*, 3165-89.
[27] Adessi, C.; Soto, C. *Curr. Med. Chem.* **2002,** *9*, 963-78.
[28] Rosenthal, I. *Photochem. Photobiol.* **1991,** *53*, 859-70.
[29] Dreschsler, U.; Pfaff, M.; Hanack, M. *Eur. J. Org. Chem.* **1999**, 3441-3453.
[30] Haywood-Small, S. L.; Vernon, D. I.; Griffiths, J.; Schofield, J.; Brown, S. B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006,** *339*, 569-576.
[31] Casas, A.; Batlle, A. M.; Butler, A. R.; Robertson, D.; Brown, E. H.; MacRobert, A.; Riley, P. A. *Br. J. Cancer* **1999,** *80*, 1525-32.
[32] Shen, W. C.; Ryser, H. J. *Mol. Pharmacol.* **1979,** *16*, 614-22.
[33] Molpus, K. L.; Hamblin, M. R.; Rizvi, I.; Hasan, T. *Gynecol. Oncol.* **2000,** *76*, 397-404.
[34] Duska, L. R.; Hamblin, M. R.; Bamberg, M. P.; Hasan, T. *Br. J. Cancer* **1997,** *75*, 837-44.
[35] Goff, B. A.; Blake, J.; Bamberg, M. P.; Hasan, T. *Br. J. Cancer* **1996,** *74*, 1194-8.
[36] Sibrian-Vazquez, M.; Jensen, T. J.; Fronczek, F. R.; Hammer, R. P.; Vicente, M. G. *Bioconjugate Chem.* **2005,** *16*, 852-63.
[37] Groisman, E. A. *Trends Microbiol.* **1994,** *2*, 444-9.
[38] Vaara, M. *Microbiol. Rev.* **1992,** *56*, 395-411.
[39] Arnold, L. J., Jr.; Dagan, A.; Gutheil, J.; Kaplan, N. O. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1979,** *76*, 3246-50.
[40] Tome, J. P.; Neves, M. G.; Tome, A. C.; Cavaleiro, J. A.; Soncin, M.; Magaraggia, M.; Ferro, S.; Jori, G. *J. Med. Chem.* **2004,** *47*, 6649-52.
[41] Soukos, N. S.; Ximenez-Fyvie, L. A.; Hamblin, M. R.; Socransky, S. S.; Hasan, T. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1998,** *42*, 2595-601.
[42] Rovaldi, C. R.; Pievsky, A.; Sole, N. A.; Friden, P. M.; Rothstein, D. M.; Spacciapoli, P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2000,** *44*, 3364-7.
[43] van Dongen, G. A.; Visser, G. W.; Vrouenraets, M. B. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2004,** *56*, 31-52.
[44] Langer, M.; Beck-Sickinger, A. G. *Curr. Med. Chem. Anti-Cancer Agents* **2001,** *1*, 71-93.
[45] Rahimipour, S.; Ben-Aroya, N.; Ziv, K.; Chen, A.; Fridkin, M.; Koch, Y. *J. Med. Chem.* **2003,** *46*, 3965-74.
[46] de Luca, S.; Tesauro, D.; Di Lello, P.; Fattorusso, R.; Saviano, M.; Pedone, C.; Morelli, G. *J. Peptide Sci.* **2001,** *7*, 386-394.
[47] Tirand, L.; Frochot, C.; Vanderesse, R.; Thomas, N.; Trinquet, E.; Pinel, S.; Viriot, M. L.; Guillemin, F.; Barberi-Heyob, M. *J. Control. Release* **2006**, in press.
[48] Chaleix, V.; Sol, V.; Huang, Y.-M.; Guilloton, M.; Granet, R.; Blais, J.-C.; Krausz, P. *Eur. J. Org. Chem.* **2003,** *8*, 1486-93.
[49] Chaleix, V.; Sol, V.; Guilloton, M.; Granet, R.; Krausz, P. *Tetrahedron Lett.* **2004,** *45*, 5295-99.
[50] Renno, R. Z.; Terada, Y.; Haddadin, M. J.; Michaud, N. A.; Gragoudas, E. S.; Miller, J. W. *Arch. Ophthalmol.* **2004,** *122*, 1002-11.
[51] Ichikawa, K.; Hikita, T.; Maeda, N.; Yonezawa, S.; Takeuchi, Y.; Asai, T.; Namba, Y.; Oku, N. *Biochim. Biophys. Acta* **2005,** *1669*, 69-74.
[52] Kostenich, G.; Livnah, N.; Bonasera, T. A.; Yechezkel, T.; Salitra, Y.; Litman, P.; Kimel, S.; Orenstein, A. *Lung Cancer* **2005,** *50*, 319-28.
[53] Reubi, J. C. *Endocr Rev* **2003,** *24*, 389-427.
[54] Shadidi, M.; Sioud, M. *Drug Resist. Updat.* **2003,** *6*, 363-71.
[55] Folkman, J. *Nat. Med.* **1995,** *1*, 27-31.
[56] Denekamp, J. *Eur. J. Clin. Invest.* **1999,** *29*, 733-6.
[57] Veikkola, T.; Karkkainen, M.; Claesson-Welsh, L.; Alitalo, K. *Cancer Res.* **2000,** *60*, 203-12.
[58] Miao, H. Q.; Lee, P.; Lin, H.; Soker, S.; Klagsbrun, M. *Faseb J.* **2000,** *14*, 2532-9.
[59] Binetruy-Tournaire, R.; Demangel, C.; Malavaud, B.; Vassy, R.; Rouyre, S.; Kraemer, M.; Plouet, J.; Derbin, C.; Perret, G.; Mazie, J. C. *Embo J.* **2000,** *19*, 1525-33.
[60] Unpublished results from our laboratory.
[61] Rosenkranz, A. A.; Jans, D. A.; Sobolev, A. S. *Immunol. Cell. Biol.* **2000,** *78*, 452-64.
[62] Sobolev, A. S.; Jans, D. A.; Rosenkranz, A. A. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2000,** *73*, 51-90.
[63] Jans, D. A.; Xiao, C. Y.; Lam, M. H. *Bioessays* **2000,** *22*, 532-44.
[64] Nigg, E. A. *Nature* **1997,** *386*, 779-87.
[65] Weis, K.; Ryder, U.; Lamond, A. I. *Embo J.* **1996,** *15*, 1818-25.

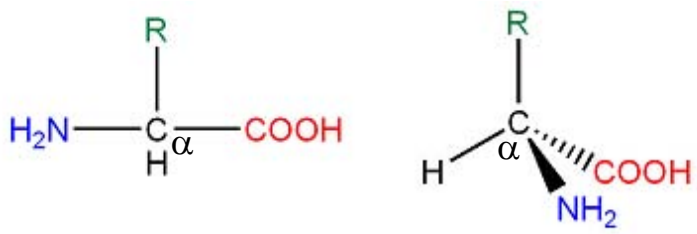
[66] Gorlich, D.; Vogel, F.; Mills, A. D.; Hartmann, E.; Laskey, R. A. *Nature* **1995,** *377*, 246-8.
[67] Kostenich, G. A.; Zhuravkin, I. N.; Furmanchuk, A. V.; Zhavrid, E. A. *J. Photochem. Photobiol. B* **1991,** *11*, 307-18.
[68] Kostenich, G. A.; Zhuravkin, I. N.; Furmanchuk, A. V.; Zhavrid, E. A. *J. Photochem. Photobiol. B* **1993,** *17*, 187-94.
[69] Kostenich, G. A.; Zhuravkin, I. N.; Zhavrid, E. A. *J. Photochem. Photobiol. B* **1994,** *22*, 211-7.
[70] Bisland, S. K.; Singh, D.; Gariepy, J. *Bioconjugate Chem.* **1999,** *10*, 982-92.
[71] Sheldon, K.; Liu, D.; Ferguson, J.; Gariepy, J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995,** *92*, 2056-60.
[72] Singh, D.; Kiarash, R.; Kawamura, K.; LaCasse, E. C.; Gariepy, J. *Biochemistry* **1998,** *37*, 5798-809.
[73] Singh, D.; Bisland, S. K.; Kawamura, K.; Gariepy, J. *Bioconjugate Chem.* **1999,** *10*, 745-54.
[74] Sobolev, A. S.; Akhlynina, T. V.; Yachmenev, S. V.; Rosenkranz, A. A.; Severin, E. S. *Biochem. Int.* **1992,** *26*, 445-50.
[75] Akhlynina, T. V.; Rosenkranz, A. A.; Jans, D. A.; Gulak, P. V.; Serebryakova, N. V.; Sobolev, A. S. *Photochem. Photobiol*. **1993,** *58*, 45-8.
[76] Akhlynina, T. V.; Rosenkranz, A. A.; Jans, D. A.; Sobolev, A. S. *Cancer Res.* **1995,** *55*, 1014-9.
[77] Sobolev, A. S.; Rozenkrants, A. A.; Giliazova, D. G. *Biophysics* **2004,** *49*, 351-79.
[78] Akhlynina, T. V.; Jans, D. A.; Rosenkranz, A. A.; Statsyuk, N. V.; Balashova, I. Y.; Toth, G.; Pavo, I.; Rubin, A. B.; Sobolev, A. S. *J. Biol. Chem.* **1997,** *272*, 20328-31.
[79] Akhlynina, T. V.; Jans, D. A.; Statsyuk, N. V.; Balashova, I. Y.; Toth, G.; Pavo, I.; Rosenkranz, A. A.; Naroditsky, B. S.; Sobolev, A. S. *Int. J. Cancer* **1999,** *81*, 734-40.
[80] Rosenkranz, A. A.; Lunin, V. G.; Sergienko, O. V.; Gilyazova, D. G.; Voronina, O. L.; Jans, D. E.; Kofner, A. A.; Shumiantseva, M. A.; Mironov, A. F.; Sobolev, A. S. *Russian J. Genet.* **2003,** *39*, 198-206.
[81] Jiang, J.; Sharma, S. D.; Fink, J. L.; Hadley, M. E.; Hruby, V. J. *Exp. Dermatol.* **1996,** *5*, 325-33.
[82] Funasaka, Y.; Sato, H.; Chakraborty, A. K.; Ohashi, A.; Chrousos, G. P.; Ichihashi, M. *J Investig. Dermatol. Symp. Proc.* **1999,** *4*, 105-9.
[83] Chen, J.; Cheng, Z.; Miao, Y.; Jurisson, S. S.; Quinn, T. P. *Cancer* **2002,** *94*, 1196-201.
[84] Rosenkranz, A. A.; Lunin, V. G.; Gulak, P. V.; Sergienko, O. V.; Shumiantseva, M. A.; Voronina, O. L.; Gilyazova, D. G.; John, A. P.; Kofner, A. A.; Mironov, A. F.; Jans, D. A.; Sobolev, A. S. *Faseb J.* **2003,** *17*, 1121-3.
[85] Walker, I.; Vernon, D. I.; Brown, S. B. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004,** *14*, 441-3.
[86] Dozzo, P.; Koo, M. S.; Berger, S.; Forte, T. M.; Kahl, S. B. *J. Med. Chem.* **2005,** *48*, 357-9.
[87] Maletinska, L.; Blakely, E. A.; Bjornstad, K. A.; Deen, D. F.; Knoff, L. J.; Forte, T. M. *Cancer Res.* **2000,** *60*, 2300-3.
[88] Sibrian-Vazquez, M.; Jensen, T. J.; Hammer, R. P.; Vicente, M. G. *J. Med. Chem.* **2006,** *49*, 1364-72.
[89] Chaloin, L.; Bigey, P.; Loup, C.; Marin, M.; Galeotti, N.; Piechaczyk, M.; Heitz, F.; Meunier, B. *Bioconjugate Chem.* **2001,** *12*, 691-700.
[90] Chaloin, L.; Vidal, P.; Heitz, A.; Van Mau, N.; Mery, J.; Divita, G.; Heitz, F. *Biochemistry* **1997,** *36*, 11179-87.
[91] Rozenzhak, S. M.; Kadakia, M. P.; Caserta, T. M.; Westbrook, T. R.; Stone, M. O.; Naik, R. R. *Chem. Commun.* **2005**, 2217-9.
[92] Deshayes, S.; Plenat, T.; Aldrian-Herrada, G.; Divita, G.; Le Grimellec, C.; Heitz, F. *Biochemistry* **2004,** *43*, 7698-706.
[93] Bruchez, M., Jr.; Moronne, M.; Gin, P.; Weiss, S.; Alivisatos, A. P. *Science* **1998,** *281*, 2013-6.
[94] Chen, J.; Stefflova, K.; Niedre, M. J.; Wilson, B. C.; Chance, B.; Glickson, J. D.; Zheng, G. *J. Am. Chem. Soc.* **2004,** *126*, 11450-1.
[95] Gust, D.; Moore, T. A.; Moore, A. L.; Jori, G.; Reddi, E. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1993,** *691*, 32-47.
[96] Nicholson, D. W.; Ali, A.; Thornberry, N. A.; Vaillancourt, J. P.; Ding, C. K.; Gallant, M.; Gareau, Y.; Griffin, P. R.; Labelle, M.; Lazebnik, Y. A. *Nature* **1995,** *376*, 37-43.
[97] Weissleder, R.; Tung, C. H.; Mahmood, U.; Bogdanov, A., Jr. *Nat. Biotechnol.* **1999,** *17*, 375-8.
[98] Berger, Y.; Greppi, A.; Siri, O.; Neier, R.; Juillerat-Jeanneret, L. *J. Med. Chem.* **2000,** *43*, 4738-46.
[99] Juillerat-Jeanneret, L.; Lohm, S.; Hamou, M. F.; Pinet, F. *Lab. Invest.* **2000,** *80*, 973-80.
[100] Berger, Y.; Ingrassia, L.; Neier, R.; Juillerat-Jeanneret, L. *Bioorg. Med. Chem.* **2003,** *11*, 1343-51.
[101] Rogers, L. M.-A.; McGivern, P. G.; Butler, A. R.; MacRobert, A. J.; Eggleston, I. M. *Tetrahedron* **2005,** *61*, 6951-8.
[102] Dubowchik, G. M.; Firestone, R. A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998,** *8*, 3341-6.
[103] Hamblin, M. R.; Miller, J. L.; Ortel, B. *Photochem. Photobiol.* **2000,** *72*, 533-40.

V. Stratégies pour améliorer la stabilité peptidique

V.1 Introduction

Un peptide est un assemblage d'**acides aminés** reliés entre eux par des liaisons amides ou peptidiques. Les peptides diffèrent des protéines par leur nombre d'acides aminés (inférieur à 50) et contrairement aux protéines, les peptides ne possèdent généralement pas de structure tertiaire (Lombardi *et al.*, 2001).

La Figure 19 représente la structure d'un acide aminé. Le **carbone alpha** (carbone α ou C_α) tétraédrique est lié de façon covalente à un groupe aminé et à un groupe carboxylique. Exeptée la glycine, les acides aminés sont des molécules chirales, ils existent sous la forme de deux stéréoisomères possibles, appelés D et L, selon que le groupe ($-NH_2$) se trouve respectivement à droite ou à gauche en représentation de Fischer. Etant lié à quatre groupes différents, le carbone α est dit asymétrique. Les deux configurations possibles du C_α constituent deux isomères non identiques, ce sont des énantiomères. Chaque isomère dévie la lumière plane polarisée et est **dextrogyre (+)** ou **lévogyre (-)** suivant que la rotation du plan de polarisation de la lumière suit un sens horaire, ou antihoraire. Il n'y a pas de corrélation entre le sens de rotation du plan de polarisation (ou pouvoir rotatoire) et la configuration de l'acide aminé : ainsi la *L*-alanine est dextrogyre et se note *L*(+)-alanine. Par convention, il y a correspondance entre la représentation des oses et celle des acides aminés.



Représentation de Fisher Représentation de Cram

Figure 19 : Structure générale des acides aminés.

Le groupement amine est représenté en bleu, le groupement carboxylique en vert et la chaîne latérale en vert.

Les **acides aminés de la série *L*** représentent la grande majorité des résidus naturels qui se trouvent dans les protéines. Les acides aminés *D* se rencontrent dans certaines protéines produites par des organismes exotiques du fond des océans, comme certains mollusques. Ce

sont également des composants abondants des parois cellulaires des bactéries (Friedman, 1999).

Une **liaison peptidique** est une liaison covalente entre un atome de carbone et un atome d'azote de deux acides aminés successifs. La liaison est le résultat de la réaction entre la fonction COOH (fonction carboxyle) du premier acide aminé et la fonction NH_2 (fonction amine) du deuxième, avec comme produit secondaire la formation d'une molécule d'H_2O (Figure 20).

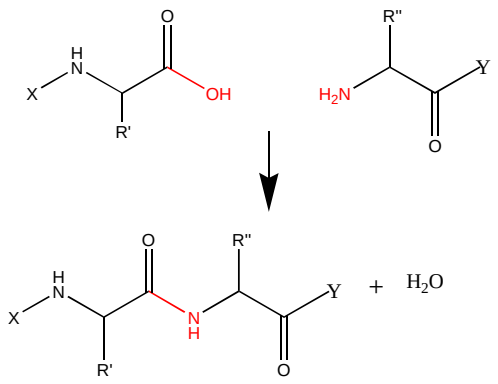


Figure 20 : Formation de la liaison entre deux acides aminés

De nombreuses enzymes sont impliquées dans la dégradation peptidique. Dans les tissus biologiques ou compartiments cellulaires, l'inactivation implique des endopeptidases spécifiques, tandis que dans la circulation systémique et dans les organes périphériques, ce sont des exopeptidases moins spécifiques qui agissent (Rawlings et Barrett, 1993).

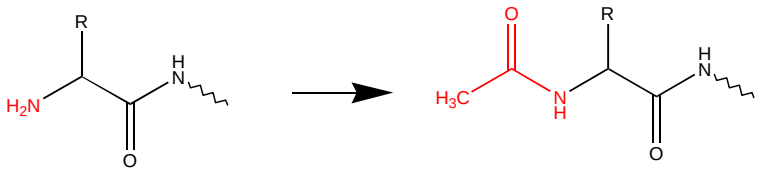
La dégradation peptidique par les peptidases est importante pour produire des molécules bioactives et les inactiver après qu'elles ont joué leur rôle. Cependant, ce processus métabolique représente un *challenge* majeur pour l'utilisation de ces peptides comme médicament. Les différentes stratégies possibles permettant d'améliorer leur stabilité *in vivo* sont décrites dans la suite du chapitre.

V.2 Peptides modifiés

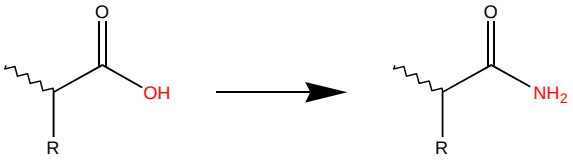
Les peptides modifiés sont des dérivés peptidiques comportant des modifications qui n'altèrent pas la liaison peptidique. Ces dérivés sont également considérés chimiquement comme des peptides.

V.2.1. Modifications *N*- et *C*-terminales

Dans le sérum et le plasma, les petits peptides sont dégradés essentiellement par des exopeptidases. La plupart des peptides possédant des acides aminés de la série *L* avec une extrémité *N*- et *C*-terminal libre sont dégradés très rapidement (quelques minutes). Certaines hormones ou certains neuropeptides sont naturellement protégés en *N*- ou *C*-terminal (*e.g.*TRH, *thyrotropin-releasing hormone*). Les amidations et les acétylations sont essentielles à la stabilité peptidique de nombreux neuropeptides (Adessi et Soto, 2002).



a. Acétylation



b. Amidation

Figure 21 : (a) Acétylation en *N*-terminal, (b) Amidation en *C*-terminal.

Les protections en *N*- et *C*-terminales (Figure 21) sont très couramment utilisées pour améliorer la stabilité de peptides pour le développement de molécules thérapeutiques. Par exemple, le peptide iAβ5 (LPFFD), non modifié, utilisé pour le traitement de la maladie d'Alzheimer est dégradé rapidement par des exopeptidases (50 % de dégradation *in vitro* après 5 minutes dans le plasma). Après modifications *N*- et *C*-terminales (Figure 22), aucune dégradation n'est observée *in vitro* après 24 heures dans le plasma et *in vivo*, la demi-vie est améliorée d'un facteur 10 (Permanne *et al.*, 2002 ; Adessi *et al.*, 2003).

Bien que ces protections soient fréquemment utilisées pour améliorer la stabilité peptidique, elles ne permettent pas la prévention d'une dégradation complète. Dans la plupart des cas, ces modifications ralentissent le catabolisme des peptides, mais la dégradation peut toujours être effectuée par l'action plus spécifique d'endopeptidases (Adessi et Soto, 2002).

Les acétylations en *N*-terminal peuvent également augmenter le caractère lipophile des peptides et peuvent ainsi améliorer le passage de ces peptides modifiés à travers les

membranes comme celle du petit intestin ou la barrière hémato-encéphalique (Weber *et al.*, 1993).

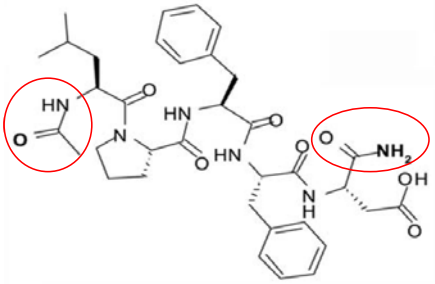


Figure 22 : Peptide LPFFD modifié en *N*- et *C*-terminales.

V.2.2. Cyclisation

La conception de peptides cycliques est également une stratégie largement répandue pour améliorer la stabilité peptidique. La cyclisation confère une contrainte structurale, qui, en réduisant la flexibilité conformationelle, peut améliorer la sélectivité, la stabilité et de ce fait la biodisponibilité (Li *et al.*, 2002 ; Trabocchi *et al.*, 2008).

Les peptides cycliques sont appelés *homodétique* si la cyclisation est due à une liaison peptidique et *hétérodétique* si la cyclisation est réalisée grâce à des ponts disulfure, ester, éther ou encore thioéther.

L'approche la plus utilisée pour synthétiser des peptides *hétérodétiques* implique la formation d'un pont disulfure entre deux cystéines. Cette stratégie implique l'incorporation de cystéines si la séquence peptidique de départ n'en possède pas. Cependant, la séquence ainsi modifiée risque de perdre son activité (Adessi et Soto, 2002). La cyclisation d'un analogue d'enképhaline a permis d'améliorer nettement le profil métabolique de ce peptide. Cette conformation cyclique a été démontrée comme étant très résistante à la dégradation enzymatique (Weber *et al.*, 1992). La cyclisation d'un peptide inhibiteur de la protésase KLK2 (*Human glandular kallikrein*) a permis d'augmenter la stabilité sans modifier l'activité biologique (Pakkala *et al.*, 2007).

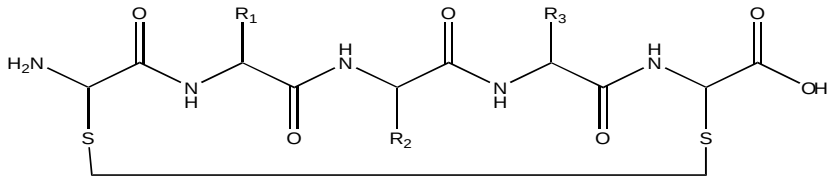


Figure 23 : Exemple de peptide cyclique *hétérodétique*.

La synthèse de peptides cycliques *homodétique* permet de diminuer le risque de perte d'activité du peptide par modification de la séquence. Une liaison amide peut être réalisée entre les groupements amine et carboxy terminaux. Le couplage de deux chaînes latérales peut également être une bonne stratégie. Ce sont généralement les peptides non essentiels à l'activité qui sont utilisés pour former un pont. Cette méthode a été, entre autre, utilisée pour la synthèse d'un analogue d'un épitope de myéline (Tselios *et al.*, 1999) et d'un analogue d'un anti sclérosique (Matsoukas *et al.*, 2005).

La faisabilité de synthèse des peptides cycliques analogues de peptides linéaires dépend de la séquence, de la longueur du peptide et de la composition en acides aminés. En effet, les résidus proline créent naturellement des coudes ou des boucles facilitant ainsi la macro-cyclisation de la molécule peptidique (Adessi et Soto, 2002).

V.2.3. Alkylation de la liaison amide

La méthylation de la liaison amide est une des modifications les plus communément utilisées pour améliorer la stabilité peptidique. En effet, cette stratégie permet de prévenir la dégradation par des endopeptidases de la liaison amide ainsi méthylée (Chatterjee *et al.*, 2008b).

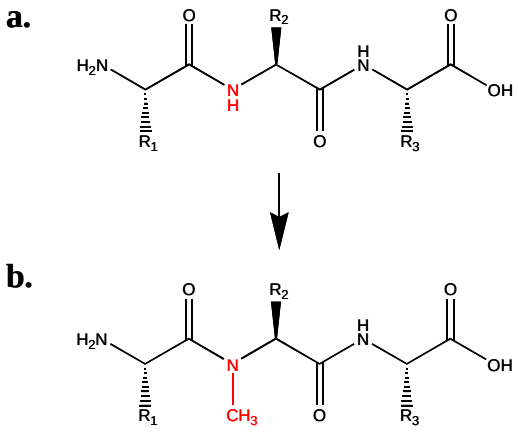


Figure 24 : (a) Peptide naturel, (b) Peptide *N*-méthylé.

Des analogues méthylés de la substance P (RPKPQQFFGLM-NH_2), un composé hypotenseur et contractant musculaire, se sont révélés être résistants à l'action de plusieurs enzymes protéolytiques (Wormser *et al.*, 1990). Un peptide immunosuppresseur, la cyclosporine A possède pas moins de sept liaisons amides méthylées sur onze résidus

d'acides aminés au total (Rozycki *et al.*, 1992). Un analogue N-méthylé d'endomorphine s'est révélé plus stable vis-à-vis d'enzymes spécifiques (Janecka *et al.*, 2006).

Cependant, ces *N*-alkylations induisent une diminution de la flexibilité conformationnelle des peptides en empêchant la formation de liaisons hydrogène et en facilitant des conformations amide *cis (*Adessi et Soto, 2002).

V.2.4. Modifications de la chaîne latérale

Une approche simple pour stabiliser un peptide est de modifier la chaîne latérale de résidus d'acides aminés impliqués dans le site de reconnaissance de protéases. Les acides aminés d'intérêt sont remplacés par des acides aminés naturels ou non possédant une chaîne latérale chimiquement proche. Le but est ici de modifier le site de reconnaissance enzymatique en préservant l'activité peptidique.

L'incorporation d'acides aminés non codés dans la séquence peptidique est une approche largement utilisée dans l'ingénierie du développement de peptides thérapeutiques. De plus, l'introduction d'acides aminés non naturels génère des modifications de structures secondaires et tertiaires permettant d'augmenter la stabilité des séquences peptidiques (Balaram, 1992).

V.2.5. Changements de chiralité

Les protéines naturelles sont composées uniquement de *L*-acides aminés. Cette spécificité stéréochimique est importante pour la reconnaissance et l'interaction des protéines entre elles. Le remplacement de toute ou d'une partie de la séquence peptidique par des *D*-acides aminés peut améliorer la stabilité peptidique vis-à-vis des dégradations protéolytiques (Figure 25). Un autre avantage de cette stratégie est que les *D*-acides aminés sont moins immunogènes que leurs analogues *L*-acides aminés (Gill *et al.*, 1963).

L'inconvénient majeur à l'utilisation de *D*-acides aminés est la baisse d'activité due au changement de conformation. Pour pallier ce problème, Schumacher *et al.*, ont proposé une approche basée sur une technique de *phage display* en image miroir. La technique consiste à synthétiser la protéine cible d'intérêt en utilisant des *D*-acides aminés. Cette protéine est utilisée pour sélectionner par *phage display* des peptides constitués de *L*-acides aminés. Pour des raisons de symétrie, l'image miroir de ces peptides sélectionnés sont des *D*-peptides qui interagissent avec la protéine cible dans sa configuration naturelle (Schumacher *et al.*, 1996). Une autre stratégie prometteuse pour l'utilisation de *D*-peptides est la synthèse de rétro-

inverso peptides. Il s'agit d'inverser la séquence peptidique et de modifier la chiralité du peptide (Figure 25). Structurellement, le rétro-inverso peptide est beaucoup plus proche du peptide initial que l'analogue *D*-peptidique puisque la double inversion de la séquence et de la stœchiométrie induit une disposition spatiale des chaînes latérales identique à celle du *L*-peptide (Chorev et Goodman, 1993). Un peptide rétro-inverso analogue de prosaptide reste intact dans le plasma et le cerveau 60 minutes après injection chez le rat (Taylor *et al.*, 2000).

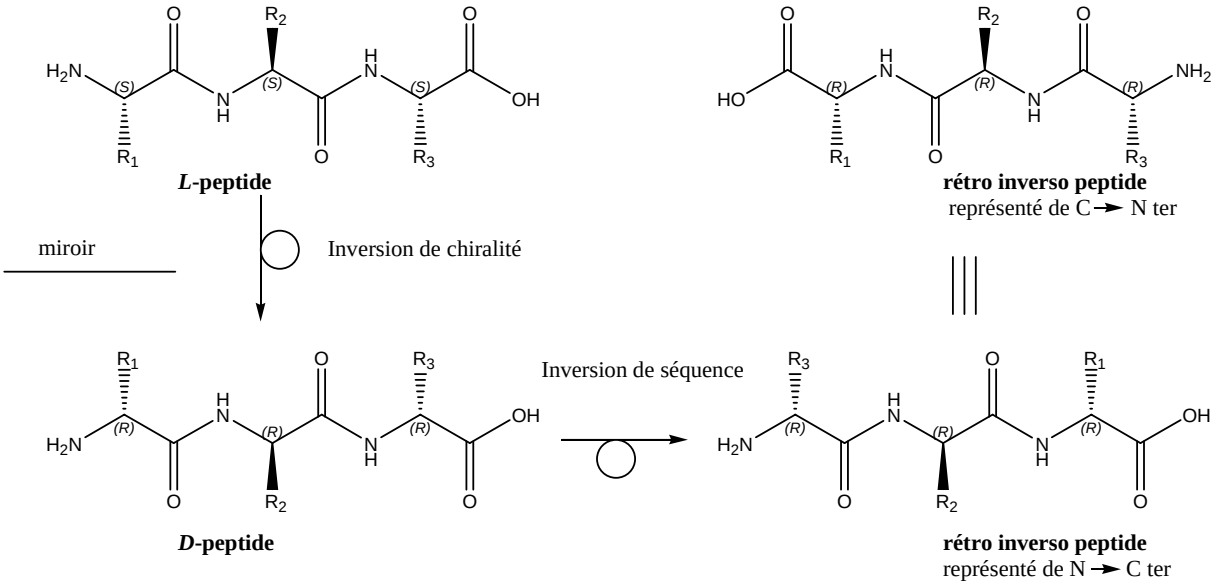


Figure 25 : ***L*-peptide, *D*-peptide et rétro inverso peptide.**

V.3 Pseudopeptides

Les pseudopeptides résultent de la modification ou du remplacement d'acides aminés composant le squelette peptidique. Ces molécules, bien que très proches des peptides ne peuvent pas être qualifiées ainsi en tant que tel. Elles représentent ainsi un intermédiaire entre les peptides modifiés et les peptido-mimétiques. Le squelette peptidique inclus la liaison amide et le carbone α.

V.3.1. Substitution de la liaison amide

Il s'agit ici de remplacer la liaison amide par un autre groupement chimique. Pour désigner ces remplacements, la nomenclature « psi-crochet » (exemple Figure 26) est utilisée pour indiquer le type de structure chimique réalisée (Spatola, 1983).

L'introduction de ces modifications permet de prévenir complètement la dégradation de la liaison amide par les protéases mais peut modifier les propriétés biochimiques des peptides (conformation, flexibilité et hydrophobie). La substitution d'une liaison amide est un compromis entre les effets positifs sur la pharmacocinétique ainsi que sur la biodisponibilité et les effets négatifs sur l'activité ainsi que sur la spécificité. Certaines substitutions de liaisons amides sont plus lipophiles, d'autres plus hydrophiles, que la liaison amide correspondante. Ces modifications peuvent être des avantages pour le transport, la liaison aux récepteurs ou les interactions membranaires (Adessi et Soto, 2002).

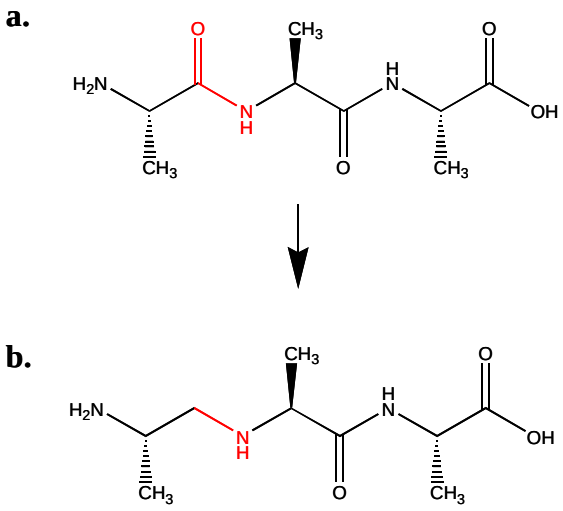


Figure 26 : Structure chimique de AlaAlaAla (a) et Alaψ[CH_2NH]AlaAla (b).

Une substitution CH_2SH dans des analogues d'enképhaline s'est révélée plus efficace à l'extrémité qu'à l'intérieur de la séquence peptidique (Hudson *et al.*, 1980). Un octapeptide inhibiteur de la rénine, contenant une liaison réduite CH_2NH, présente une forte affinité pour cette dernière et une résistance aux enzymes hydrolytiques (Szelke *et al.*, 1982).

Un point important dans la sélection de liaisons amides réduites est la conservation de la stéréochimie du peptide initial. La capacité des substituts de liaisons amides à mimer les propriétés stériques, électroniques et de solvatation de la liaison peptidique est très importante dans le choix des analogues pseudopeptides. En principe, une substitution CH=CH est le meilleur choix pour maintenir la planéité et la rigidité de la liaison amide (Adessi et Soto, 2002). Dans le cas d'analogues d'enképhaline, la liaison CH=CH en *N*-terminal permet une activité similaire au peptide initial tout en le protégeant de la dégradation (Handa *et al.*, 1981).

Le remplacement isostérique du lien amide par une liaison peptidique réduite ψ[CH_2NH] a été décrit pour la première fois en 1971 (Atherton *et al.*, 1971). Par la suite, un analogue de la rénine contenant une liaison peptidique réduite a été montré comme étant un puisant inhibiteur de la rénine (Szelke *et al.*, 1982). Cet analogue constitue une approche intéressante pour le *design* d'inhibiteurs d'enzyme bioactifs. En plus de son potentiel à limiter la dégradation enzymatique et d'augmenter l'hydrophilie, le lien amide réduit, lorsqu'il est introduit dans des hormones, peut également conduire à des antagonistes (Martinez *et al.*, 1985 ; Coy *et al.*, 1988). La procédure pour introduire une liaison amide réduite est bien établie et relativement facile tant en solution qu'en synthèse sur phase solide. Il a été montré que l'entité -CH_2NH- est isostère de l'état de transition tétrahédrique formé pendant l'hydrolyse d'une liaison amide et est donc liée à l'enzyme plus fermement que le substrat (Lienhard, 1973). L'introduction d'un groupe amino qui pourrait être protoné dans les conditions physiologiques peut aussi influencer l'interaction avec le récepteur et augmenter la solubilité dans les systèmes aqueux. Les études de RMN ^{1}H et ^{13}C ont montré que les modifications produites par le remplacement de -CONH- par -CH_2NH- sont localisées autour de cette entité. Cependant, comme une liaison peptidique induit une certaine rigidité à la molécule, son remplacement par une liaison réduite augmente la flexibilité.

Une des caractéristiques du remplacement d'une liaison amide par ψ[CH_2NH] est l'introduction d'un nouveau site basique et la protection de l'amine secondaire peut être exigée pendant l'élongation peptide. Pourtant, il a été montré par Sasaki *et al.* que le substitut ψ[CH_2NH] est généralement résistant à l'acylation, excepté pour l'incorporation du résidu Gly, sans doute en raison d'un facteur stérique (Sasaki *et al.*, 1987).

V.3.2. Peptoïdes

Le concept et la synthèse de peptoïdes comme molécules actives ont été pour la première fois décrits par Simon *et al.*, 1992. La chaîne latérale située sur le carbone α est déplacée d'une position sur le groupement amine de la liaison amide (Figure 27). Les peptoïdes peuvent être considérés comme des oligoglycines *N*-substituées.

La structure particulière des peptoïdes leur confère une très grande stabilité. En effet, les protéases ne reconnaissent pas ces liaisons amides *N*-substituées. Les peptoïdes présentent une plus grande flexibilité structurale que les peptides et peuvent ainsi facilement reconnaître la protéine cible. De plus, l'absence d'hydrogène amide empêche la formation de liaison hydrogène et minimise ainsi la formation de structures secondaires. Cette caractéristique

augmente l'espace conformationnel des peptoïdes mais peut affecter leur activité biologique si cette dernière nécessite une structure particulière (Adessi et Soto, 2002).

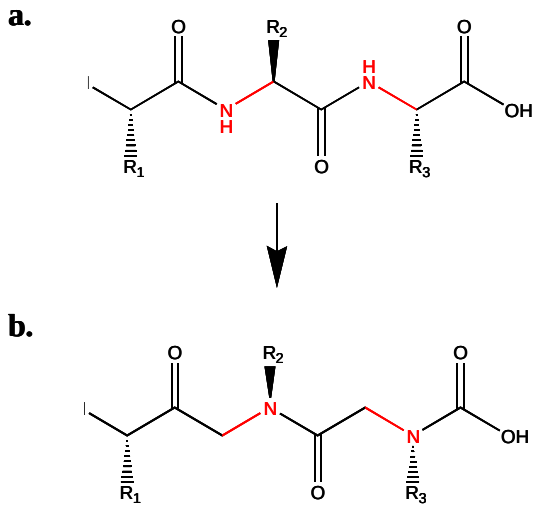


Figure 27 : (a) Modèles de peptide naturel, (b) modèle de peptoïde.

Cette stratégie est utilisée pour synthétiser des antagonistes du récepteur à l'endothéline (Dasgupta *et al.*, 2001).

V.3.3. Azapeptides et azatides

Les azapeptides sont des molécules dont un ou plusieurs carbones α sont remplacés par un atome d'azote. Lorsque tous les carbones α sont remplacés ces molécules sont appelées azatides. Ces molécules sont décrites comme étant enzymatiquement plus stables que les peptides et sont couramment utilisées comme des inhibiteurs de protéases.

Un azapeptide (BMS-232632) a été décrit comme étant un puissant inhibiteur d'une protéase impliquée dans le clivage d'une protéine virale précurseur du virus HIV-1. Une étude a montré que ce composé est plus sélectif et moins toxique que d'autres composés ayant la même cible (Robinson *et al.*, 2000). Cet inhibiteur de la protéase du VIH a été commercialisé en France par Bristol-Meyer-Starib sous le nom de Reyataz® en mars 2004 (DCI : Atazanavir). Du fait de sa structure, il est également classé parmi les peptidomimétiques (Figure 28).

D'autres azapeptides ont été utilisés comme inhibiteurs de protéases telles que l'angiotensine, la chymotrypsine, la subtilisine, la cathepsine, l'élastase, la papaïne, le virus de l'hépatite C (Adessi et Soto, 2002 ; Bailey *et al.*, 2004 ; Verhelst *et al.*, 2006 ; Wieczerzak *et al.*, 2007).

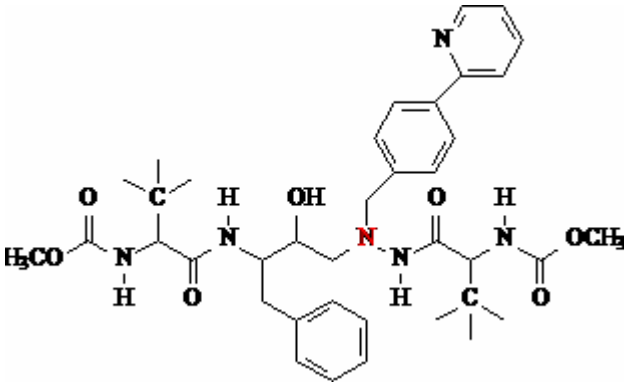


Figure 28 : Structure chimique du Reyataz® (Atazanavir, BMS-232632).

V.4 Peptidomimétiques

Un peptidomimétique (ou analogue non peptidique) est une petite molécule qui mime l'activité biologique d'un peptide sans en avoir sa nature chimique. Ces molécules ont souvent un poids moléculaire inférieur à 700 Da et présentent couramment une biodisponibilité et une stabilité métabolique suffisantes pour une administration orale. Cependant ces composés révèlent souvent des problèmes de toxicité, de solubilité et de spécificité en comparaison aux peptides naturels ou modifiés (Adessi et Soto, 2002).

Les peptidomimétiques peuvent être réalisés soit par un *design* rationnel, soit par un criblage à haut débit :

- L'élaboration rationnelle de peptidomimétiques implique de connaître la structure peptidique ainsi que les groupements chimiques responsables de l'activité biologique. Le but est de synthétiser une molécule assez rigide pour qu'elle n'adopte qu'une seule conformation majeure et possède le groupe chimique actif dans la même orientation que le peptide d'intérêt. Il est très difficile de construire un peptidomimétique analogue de peptide possédant plus de quatre résidus d'acides aminés par cette méthode rationnelle (Moore, 1994).

- La méthode de criblage à haut débit est beaucoup plus utilisée pour l'élaboration de peptidomimétiques (al-Obeidi *et al.*, 1998). En effet, il existe de nombreuses banques de données de peptidomimétiques.

Etude comparative de la TPC versus *TPC-Ahx-ATWLPPR* in vitro *et* in vivo

Chapitre II : Etude comparative de la TPC versus TPC-Ahx-ATWLPPR in vitro et in vivo

I. Résumé

Au laboratoire, il avait été préalablement démontré que la TPC-Ahx-ATWLPPR se liait à NRP-1 et que le PS conjugué était beaucoup plus efficace que le PS seul (TPC) sur les HUVEC (*human umbilical vein endothelial cell*) exprimant NPR-1 (Tirand *et al.*, 2006). Pour quantifier l'implication de NPR-1 dans **l'incorporation cellulaire** de la TPC-Ahx-ATWLPPR, nous avons développé une lignée dont l'expression de NRP-1 a été diminuée par une technique d'ARN interférence dont la méthodologie est développée dans le chapitre V. Nous avons mis en évidence une diminution statistiquement significative (environ 60 %) de l'incorporation de la TPC-Ahx-ATWLPPR pour la lignée *knockdown* obtenue par ARN interférence.

La **validation de la sélectivité *in vivo*** a été évaluée chez la souris *nude* xénogreffée en ectopique par un gliome malin humain. Par un marquage immunohistochimique des cellules endothéliales, nous montrons que seul le PS conjugué permet une accumulation sélective 4 h après administration i.v. au niveau de l'endothélium vasculaire tumoral.

Afin de valider l'apport de la conjugaison à l'heptapeptide sur l'**efficacité *in vivo*** de la stratégie anti-vasculaire, nous avons effectué un **suivi de croissance tumorale** après PDT comparant la TPC et la TPC-Ahx-ATWLPPR, dans les conditions optimales déterminées par les résultats du plan d'expériences (Tirand et *al.*, publication soumise, présentée en annexe du manuscrit). L'efficacité photodynamique du conjugué a induit un retard de croissance statistiquement significatif par rapport au PS libre.

Afin de valider la **réponse vasculaire** de l'approche, nous avons réalisé un suivi de l'évolution du **flux sanguin pendant le traitement**. Seul le conjugué a induit des variations de flux sanguin d'environ 50 % pendant le traitement.

II. "Peptide-conjugated chlorine-type photosensitizer binds neuropilin-1 *in vitro* and *in vivo*"

Thomas N., Bechet D., Tirand L., Becuwe P., Vanderesse R., Frochot C., Guillemin F., Barberi-Heyob M.

Journal of Photochemistry Photobiology B : Biology. Sous presse

PEPTIDE-CONJUGATED CHLORIN-TYPE PHOTOSENSITIZER BINDS NEUROPILIN-1 *IN VITRO* AND *IN VIVO*

Noémie Thomas [a], Denise Bechet [a], Philippe Becuwe [b], Loraine Tirand [a], Régis Vanderesse [c,e], Céline Frochot [d,e], François Guillemin [a,e], Muriel Barberi-Heyob [a,e*]

[a] Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), Nancy-University, CNRS, Centre Alexis Vautrin, Vandœuvre-lès-Nancy, France ; [b] Laboratoire de Biologie Cellulaire, EA PREDICTHER, Nancy-University, Vandœuvre-lès-Nancy, France ; [c] Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM), Nancy-University, CNRS, Nancy, France ; [d] Département de Chimie Physique des Réactions (DCPR), Nancy-University, CNRS, Nancy, France ; [e] GDR CNRS 3049 "Médicaments Photoactivables - Photochimiothérapie (PHOTOMED)"

Address correspondence to:
Dr. Muriel Barberi-Heyob
Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Centre Alexis Vautrin
Avenue de Bourgogne, Brabois,
F-54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France
Telephone: +33 3 83 59 83 76
m.barberi@nancy.fnclcc.fr

Abstract

The strategy developed aims to favor the vascular effect of photodynamic therapy (PDT) by targeting tumor vasculature. This approach is considered by coupling a photosensitizer (PS) to an heptapeptide targeting neuropilin-1 (NRP-1). We previously demonstrated that this new conjugated PS, which binds to recombinant NRP-1 protein, was a much more potent PS compared to the non-conjugated PS in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) expressing NRP-1, due to the coupling of the peptide moiety. To argue the involvement of NRP-1 in the conjugated PS cellular uptake, MDA-MB-231 breast cancer cells were used, strongly over-expressing NRP-1 receptor, and we evidenced a significant decrease of the conjugated PS uptake after RNA interference-mediated silencing of NRP-1. In mice xenografted ectopically with U87 human malignant glioma cells, we demonstrated that only the conjugated PS allowed a selective accumulation in endothelial cells lining tumor vessels. Vascular endothelial growth factor (VEGF) plasma and tumor levels could not prevent the recognition of the conjugate by NRP-1. The vascular effect induced by the conjugated PS, was characterized by a reduction in tumor blood flow around 50% during PDT. *In vivo*, the photodynamic efficiency with the conjugated PS induced a statistically significant tumor growth delay compared to the non-coupled PS. The peptide-conjugated chlorin-type PS uptake involves NRP-1 and this targeting strategy favors the vascular effect of PDT *in vivo*.

Keywords *:* targeted phototherapy, vascular effect, neuropilin-1, siRNA, peptide, glioma-bearing nude mice

1. Introduction

The selectivity of photodynamic therapy (PDT) as an anti-cancer treatment relies on the local generation of cytotoxic reactive oxygen species in the tumor tissue, due to both preferential uptake of the photosensitizer (PS) and subsequent localized light irradiation. Until now, most of the efforts in the development of tumor targeting-PSs have focused on the targeting of markers over-expressed by tumor cells themselves. However, PDT effects are mediated not only through direct killing of tumor cells but also through indirect effects, involving both initiation of an immune response against tumor cells and destruction of the vasculature.

Vascular-targeting therapy is a promising strategy in cancer treatment that has received considerable attention [1,2]. Although vascular damage has long been known to contribute to the overall PDT treatment effect [3,4], intentional use of this approach based on the PS pharmacokinetics to maximize clinical effect is a much recent consideration, beginning with the use of Visudyne® for age-related macular degeneration treatment. Following this success, the PDT vascular targeting regimen with a short drug-light interval (DLI) has been used in combination with another photosensitizing agent Tookad® [5]. Thus, passive targeting of tumor vasculature based upon the temporal confinement of an intra venous (i.v.) injected PS is practically the most effective approach to targeting tumor blood vessels. Although there are a variety of potential tumor vascular markers that can be exploited for the selective vascular targeting using tumor vasculature homing molecules, a marker that is exclusively specific for tumor vasculature has not yet been found [6].

In order to potentiate the vascular effect of PDT, receptors specifically expressed by angiogenic vascular endothelial cells, such as receptors to vascular endothelial growth factor (VEGF), can be suggested as molecular targets. We previously described the conjugation of a PS (5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin, TPC), *via* a spacer (6-aminohexanoic acid, Ahx), to an heptapeptide (ATWLPPR), specific for the VEGF receptor neuropilin-1 (NRP-1). This targeted PS (TPC-Ahx-ATWLPPR) proved to be very efficient in HUVEC, compared to its non-conjugated counterpart TPC. We also evidenced *in vitro* by competition experiments in HUVEC [7] and *in vivo* by biodistribution studies in nude mice xenografted with U87 human malignant glioma [8,9] that a part of the accumulation of the conjugated PS

was related to non-neuropilin-dependent mechanisms, involving either other VEGF receptors or non-specific mechanisms. Taking advantage of RNA silencing techniques known as RNA interference (RNAi), we have selectively silenced NRP-1 expression in MDA-MB-231 breast cancer cells to provide the evidence for the involvement of NRP-1 expression in TPC-Ahx-ATWLPPR cellular uptake. We also observed *in vivo* the vascular effect by measuring the tumor blood flow during PDT using both conjugated and non-conjugated PSs.

2. Experimental

2.1. Photosensitizers

TPC was purchased from Frontier Scientific (Logan, UT). TPC-Ahx-ATWLPPR was synthesized and purified as described previously [7,8]. Stock solutions in dimethylsulfoxide (2 mM) were used. The PSs were diluted in polyethylene glycol (PEG) 400/ethanol/water (30:20:50, v/v/v) to the concentration required for i.v. injection to mice (200 µL/25 g body weight). Concentrations were checked using a Perkin-Elmer UV-visible spectrophotometer (Lambda 2, Courtabœuf, France), using the molar extinction coefficients reported previously [7].

2.2. Binding of TPC versus TPC-Ahx-ATWLPPR to recombinant NRP-1 protein

Neuropilin-1 was obtained from R&D Systems (Lille, France), as recombinant chimeric protein. The surface of Maxisorp microplates (Dutscher) was coated with NRP-1 (2 µg/mL) in phosphate buffered saline (PBS), overnight at room temperature. The plates were blocked with PBS containing 0.5% bovine serum albumin (BSA, blocking buffer) during 1 h at 37°C, to prevent non-specific interactions. Binding of the PSs to NRP-1 was assessed using 5 ng/mL of biotinylated $VEGF_{165}$ (R&D Systems) in blocking buffer containing 2 µg/mL heparin. Biotinylated $VEGF_{165}$ was added to the coated wells, in competition with an excess of TPC-Ahx-ATWLPPR or TPC, alone without any addition (negative control) or unlabelled $VEGF_{165}$ as positive control (0.5 µg/mL, R&D Systems). In the case of TPC-Ahx-ATWLPPR or TPC (1 mM), 0.5% Tween-20 was added to the blocking buffer in order to allow for their solubilization. After a 2 h-incubation at room temperature, the plates were washed and the amount of bound biotinylated $VEGF_{165}$ stained with streptavidin horseradish peroxidase conjugate (R&D Systems) and assayed. After 20 min at room temperature, reaction was stopped by the addition of Stop Solution (R&D Systems). Optical densities were measured at

450 nm. Results were expressed as relative absorbance to wells containing only blocking buffer. Three wells per condition were used.

2.3. Cell lines and culture

For *in vitro* experiments, MDA-MB-231 human breast cancer cells were purchased from American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). Cells were maintained in minimum essential medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 1% antibiotic/antimitotic solution. They were cultured in 75 cm^2 flasks and incubated in 5% CO_2/95% humidified air at 37°C. U87 human malignant glioma cells (ATCC, HTB-14) were used for *in vivo* experiments as described previously [9]. Cell culture materials were purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France). All other chemicals were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France), unless otherwise stated.

2.4. NRP-1-siRNA vector and transfection

RNA silencing technique known as RNAi was used, as described previously [12]. Small interfering RNA (siRNA) oligonucleotides were obtained from Eurogentec in a purified and annealed duplex form. The sequences targeting the human NRP-1 gene are : 5'-GAGAGGTCCTGAATGTTCC-3' (sense) and 5'-GGAACATTCAGGACCTCTCC-3' (antisense). Scrambled siRNA with the following sequence : 5'-UUAAACUUCAGCCCAGUGA-3' (sense) and 5'-CAGUAAACGCCGUCUUAUA-3' (antisense) was used as control. Double strand DNA oligonucleotide encoding the effective siRNA in the knockdown of NRP-1 was synthesized with a loop sequence TTCAAGAGA and a RNA pol III terminator sequence consisting of a 6 poly T. This double strand DNA oligonucleotide was cloned into the RNAi-ready pSIREN vector (BD Biosciences Clontech) between the *BamHI* and *EcoRI* restriction sites with the U6 promoter. This vector contains a puromycin resistance gene for the selection of stable transfectants. A unique *Xba I* restriction site was placed downstream of the terminator sequence for restriction digest analysis to confirm the presence of the cloned insert. Four µg of pSIREN/NRP-1-siRNA vector or pSIREN empty vector were used for stable transfection of MDA-MB-231 cells with jetPEI™ transfection reagent, according to the manufacturer's instructions (Eurogentec). The MDA-MB-231 clones were selected with 0.5 µg/mL of puromycin for 3 weeks.

Single colonies were isolated and then screened for levels of the expression of NRP-1 protein by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot

analyses. Five days before the experiments, the cells were placed into complete medium without puromycin supplement.

2.5. Proteins extraction and western blotting analysis

Cells (MDA-MB-231 clones) were collected by scraping, washed with ice-cold PBS and treated with lyses buffer, containing 10 mM Tris–HCl (pH 7.4), 1% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), 2 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) and 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) for 30 min on ice, and further centrifuged at 15,000 *g* for 20 min at 4°C. Total protein concentration was determined using the DC Protein Assay (Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France), according to the manufacturer's instructions. Protein samples (25 µg) were heated to 95°C for 7 min in the presence of 5% 2-mercaptoethanol, chilled on ice and separated on a 7.5% denaturing polyacrylamide gel, followed by electrophoretic transfer to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked with 5% (w/v) non-fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.1% (v/v) Tween-20 (TBST), overnight at 4°C. Membranes were then incubated for 1 h with polyclonal anti-NRP-1 (sc-7239, Santa Cruz Biotechnology, Tebu, Le Perray en Yvelines, France), diluted 1:200 in 5% (w/v) nonfat dry milk in TBST. After several washes, the blots were incubated with secondary anti-goat antibody linked to horseradish peroxidase (Donkey Anti-goat IgG-HRP sc-2020, Santa Cruz, 1:2000). Bound antibody was detected using the ECL detection system (Amersham Biosciences, Orsay, France) and visualized by autoradiography. To ensure equal loading of proteins, blots were subsequently stripped and probed with a polyclonal anti-tubulin (sc-9104, Santa Cruz Biotechnology), using the procedure described above.

2.6. RNA Isolation and RT-PCR analysis

Isolation of total RNA was performed using TRIzol Reagent (Invitrogen). Complementary DNA (cDNA) synthesis was performed with 1 µg of total RNA in a reaction volume of 20 µL containing 4 µL of BioRad reaction mixture 5X and 1 µL of BioRad Iscript reverse transcriptase (Iscript cDNA synthesis kit BioRad) and incubated 5 min at 25°C, 30 min at 45°C and 5 min at 75°C in a thermocycler Eppendorf. Each sample was stored at -20°C.

PCR reactions were performed with 2 µL of the cDNA mixture in a volume of 20 µL containing 0.5 µM of each 5'- and 3'- primers, 1.6 µL dNTP 2.5 nM (Kit In vitrogen dNTP Set), 2 µL Buffer 10X, 0.6 µL $MgCl_2$ 50 mM and finally 0.2 µL of Taq DNA polymerase (Kit

In vitrogen TaqDNA pol). The primer sequences were as follow : NRP-1, 5'-ATGGAGAGGGGGCTGCCG-3' (sense), 5'- CTATCGCGCTGTCGGTGTA-3' (antisense) [13] ; GAPDH, 5'-TGGGGAAGGTGAAGGTCGGA-3' (sense) and 5'-GGATCTCGCTGCTGGAAGA-3' (antisense) [14]. Tubes were incubated for amplification for 15 min at 95°C, 1 min at 55°C and 1 min at 72°C for cycle 1 (Thermocycler Eppendorf). For cycle 2 to 29 : 30 s at 95°C, 1 min at 55°C and 1 min at 72°C. For cycle 30 : 30 s at 95°C, 1 min at 55°C and 10 min at 72°C. GAPDH and NRP-1 products were analyzed using 1% agarose gel electrophoresis with 1 µg/mL ethidium bromide. Quantifications were performed by ultraviolet transillumination using Gel Doc EQ (BioRad).

2.7. Comparison of intracellular uptake between MDA-MB-231 wild-type (WT) and MDA-MB-231 NRP-1 siRNA (NRP-1 siRNA) cells

Cells were seeded in 96 wells plate (2.10^4 cells/well). Two plates per cell line were prepared. After 3 days, medium containing TPC or TPC-Ahx-ATWLPPR (5 µM) was added for 24 h. Two plates per cell line were used, the first one to evaluate cellular viability using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay, the second plate for intracellular incorporation. Cells were centrifuged (1,200 g ; 5 min) and re-suspended in ethanol. Photosensitizers were extracted by a 10 min-sonication (Branson 1200, Roucaire Instruments Scientifiques, Les Ulis, France). Cell debris were removed by centrifugation (3,500 g ; 15 min). Fluorescence (recorded at 652 nm following excitation at 415 nm) was measured on a flx-Xenius spectrofluorimeter (SAFAS, Monaco).

2.8. Animals and tumor model

Female athymic Foxn1 nude mice (*nu/nu*) were used for this study (Harlan, Gannat, France). Animal care and studies were performed according to the European convention for the protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, EU directives and The Law on Statute on Animal Experiments in France. All experimental protocols were approved by the Committee for Care and use of Animals in Experiments at Nancy-University. Mice (6-7/cage) were maintained in standard cages in isolators. Animals were housed with 12 h light/dark cycle at 22-24°C and 50% humidity, and they were administered with the diets and water *ad libitum*. The mice were used for tumor implantation when they were 7-9 weeks old (20-25 g). They were anesthetized using an intra peritoneal injection of a mixture of ketamine (Ketalar®, Panpharma, Fougères, France) and xylazine (Rompun®, Bayer Pharma, Puteaux, France) at a dose of 60 mg/kg and 8 mg/kg, respectively.

The model of human malignant glioma was obtained using U87 cells as described previously [15]. Tumors were treated when they reached a treatment size of 5±1 mm geometric mean diameter (15±5 days after tumor grafting).

2.9. *ELISA tests detecting human VEGF (secreted by U87 tumor cells) and murine VEGF (secreted by host cells, e.g. macrophages)*

Protein expressions of murine and human VEGF were assessed using sandwich ELISA. Assays were performed by means of a commercial quantitative immunoassay kits for human (DVE00, Research & Diagnostic Systems, Minneapolis, MN) and mouse (MMV00, R&D Systems) VEGF. Analyses were carried out according to the manufacturer's protocol using VEGF standards ranging from 15.6 to 2 000 pg/mL (human VEGF) and from 7.8 to 500 pg/mL (mouse VEGF). All samples (plasma and tumor tissue) were analyzed in duplicate in the same assay. Blood samples, obtained by cardiac puncture of mice under anesthesia, were collected in Vacutainer® containing ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) plasma separating tubes and centrifuged at 4°C. Plasma was immediately pooled, aliquoted, frozen, and stored at -70°C until assayed. Tumor tissue extracted was rinsed with ice-cold PBS and sectioned with scalpel. Fragments were centrifuged at 100 ***g*** for 10 min. For whole-cell lysates, tissue fragments were resuspended in cold lysis buffer (20 mM Tris, pH 7.5/137 mM NaCl/100 mM NaF/10% glycerol/1% Nonidet P-40/1 mM Na_2VO_4, supplemented with 1 mM PMSF/10 µg/mL aprotinin/10 µg/mL leupeptin).

2.10. Fluorescence imaging of PSs and vascular endothelium

The intra tumoral distribution of the PSs was investigated by using their fluorescence emission properties, and colocalization with angiogenic endothelial cells. Post i.v. injections of 1.75 µmol/kg of TPC-Ahx-ATWLPPR or TPC, tumor biopsy samples were excised from the animal under reduced light conditions (to minimize potential photobleaching of the PSs). The tumor was coated with Tissue-Tek® OCT (Sakura Firetek, Torrance, CA, USA) and placed first in liquid nitrogen-cooled isopentane for at least 40 s, to completely freeze the biopsy, and, afterwards, placed at -80°C. The sample was mounted on the cryotome and sections that were approximately 5-7 µm thick were cut. The distribution of the PS was determined by imaging the sample immediately using a fluorescence microscope [excitation filter microscope (Provis AX-70 Olympus, Rungis, France) with an excitation filter (band pass 440-480 nm), a dichroic mirror (570 nm), and an emission filter (high pass 590 nm)].

Immediately after the TPC-Ahx-ATWLPPR tumor tissue localization, the immunohistochemical analysis of endothelial cells distribution was undertaken on the same sections. The sections were fixed 2-3 min in a buffer (Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4, 3.2 mM calcium acetate, 22.8 mM zinc acetate, 36.7 mM zinc chloride). The slides were air-dried, followed by washing in isotonic PBS-Tween (pH 7.4, 0.1% Tween 20). The sections were incubated for 2-3 h at room temperature with the primary antibody [1:20 dilution of rat anti-mouse CD31 (Pharmingen/BD Biosciences, Le-Pont-de-Claix, France) in PBS pH 7.4 with 0.1% (m/v) sodium azide, 0.06% (m/v) N-ethyl-maleimide, 1% (m/v) BSA, 30% (v/v) glycerol]. After washing the slides with PBS-Tween, the sections were incubated for 1 h with the secondary antibody (1:400 dilution in PBS-Tween of mouse pre-adsorbed, biotinylated rabbit anti-rat IgG, Clinisciences, Montrouge, France), followed by three washes with PBS-Tween. The sections were then incubated 1 h at room temperature with a fluorescent streptavidin complex (1:4000 dilution in PBS-Tween20 of Streptavidin-Alexa Fluor 488, Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). The slides were placed back on the microscope stage and the stage set at the previous co-ordinates and the same field of tissue previously imaged for photosensitizer distribution was brought into view. The distribution of CD31 in the sections was then visualized by fluorescence on the same microscope (excitation band-pass filter 460-490 nm, dichroic mirror 505 nm and emission band-pass filter 510-550 nm). Images for all sections were taken under the same microscope gain settings.

2.11. Blood flow during PDT

The measurement of tumor blood flow was performed with an Oxyflo 2000 Laser Doppler flowmeter (Oxford Optronix Ltd., UK) and using flexible fiber implantable probes (Oxyflo MSF 100 XP). A relative measure, the blood perfusion unit (BPU), was the output of the flowmeter and is representative of local flow at the distal tip of the probes. Before the experiment, all probes were calibrated by way of the kit supplied by the manufacturer. The ongoing standardization also followed the manufacturer's procedures. A low light power (<0.5 mW) was applied by a laser diode integrated into the system. The wavelength of 830 nm enables to follow front blood flow, during and after PDT. Measurements were representative of a volume of 0.3-0.5 mm^3 near the probe and was recorded 5 min before the beginning of PDT during PDT and 10 min after treatment. When the mouse was sacrificed the value of the residual flow obtained after stabilization of the signal was indicated “the physiological zero”. This value was withdrawn from the whole of the measured values and the results was presented in the form of percentage compared to the flow before PDT.

2.12. PDT efficiency in vivo

In practice, the four factors that are usually considered for PDT treatment are : the administered PS dose, DLI, light fluence and light fluence rate. To limit the number of experiments to be carried out, in our approach a DLI of 4 h was selected, corresponding to relevant conjugated PS levels in tumor, low conjugated PS levels in skin and low degradation of the peptidic moiety [8,9]. By fixing this parameter, the determination of the optimal PDT dosimetry was expressed as the optimal choice of the three remaining factors (PS dose, light fluence and fluence rate), *i.e.* selection of values leading to an optimal PDT response. Response surface methodology was previously suggested as a rational solution to select *in vivo* PDT conditions with this new peptide-conjugated PS targeting NRP-1 [11]. A Doehlert experimental design was selected to model effects and interactions of PS dose, fluence and fluence rate on the growth of U87 human malignant glioma cells xenografted in nude mice using a fixed drug-light interval. With only 13 experimental conditions tested, an optimal PDT condition was selected (PS dose: 2.80 mg/kg (1.75 µmol/kg); fluence: 120 J/cm^2; fluence rate: 85 mW/cm^2) [11]. 2.80 mg/kg of PSs was injected to the mice *via* the tail vein. The mice were kept in the dark for 4 h, and anesthetized as described above. Irradiation of tumors was carried out at 652 nm, using a dye laser (SpectraPhysics 375B, Les Ulis, France), pumped with an argon laser (Spectra-Physics 2020). Light was delivered through an optical fiber (HCG type, SEDI Fibres Optiques, Courcouronnes, France), and a light distributor (*Frontal Diffuser* FDI, *Medlight* SA, Ecublens, Switzerland) for a perfectly homogeneous illumination of the spot and illuminated the tumor surface over a 1-cm diameter beam spot. The incident fluence rate on the tumors (from 50 to 150 mW/cm^2) was evaluated using an optical power meter (SP407, SpectraPhysics). The time of irradiation was adjusted to reach the required total light fluence (comprised between 10 and 150 J/cm^2). At least nine mice were used for each condition. For the comparison of PDT efficacy using TPC and TPC-Ahx-ATWLPPR, the protocol was similar to the one described above, and the control and treatment groups were as followed :

Light-only control group. Mice were injected with PEG 400/ethanol/water (30:20:50, v/v/v) intravenously, and were irradiated 4 h later (120 J/cm^2, 85 mW/cm^2).

TPC-only control group. Mice were injected with TPC (1.75 µmol/kg) intravenously, and were not irradiated.

TPC-Ahx-ATWLPPR-only control group. Mice were injected with TPC-Ahx-ATWLPPR (1.75 µmol/kg) intravenously, and were not irradiated.

TPC treatment group. Mice were injected with TPC (1.75 µmol/kg) intravenously, and were irradiated 4 h later (120 J/cm^2, 85 mW/cm^2).

TPC-Ahx-ATWLPPR treatment group. Mice were injected with TPC-Ahx-ATWLPPR (1.75 µmol/kg) intravenously, and were irradiated 4 h later (120 J/cm^2, 85 mW/cm^2).

Following PDT, tumor diameter was measured three times a week in two orthogonal directions using an electronic caliper, and tumor volume (V) was calculated using the *formula* :

$$V = (\text{length} \times \text{width}^2) / 2$$

Measurements were carried out during 2 months, or until tumors reached a size of 1 cm^3, at which time mice were sacrificed by cervical dislocation.

Statistical analysis

Unless otherwise indicated, all data are mean values ± standard deviation (s.d.) calculated from at least three independent experiments. Mann and Whitney U test was used to test for the significant level between independent variables. The level of significance was set to $P<0.05$. Efficacy of PDT according to the response surface methodology was presented with the Kaplan-Meier model, considering the percentage of tumors not having reached 5 and 10 times their initial volume as the end-point. Statistical analysis was conducted through the log-rank test.

3. Results

3.1. Only TPC-Ahx-ATWLPPR binds to recombinant NRP-1 protein

The unconjugated PS (TPC) at 1 mM did not displace biotinylated $VEGF_{165}$ binding bound. On the contrary, binding of biotinylated $VEGF_{165}$ to recombinant NRP-1 protein was displaced by both $VEGF_{165}$ and TPC-Ahx-ATWLPPR (Fig. 1). As $VEGF_{165}$ binding to its receptors is heparin dependent, the competitive binding experiments were always carried out in the presence of heparin (2 µg/mL).

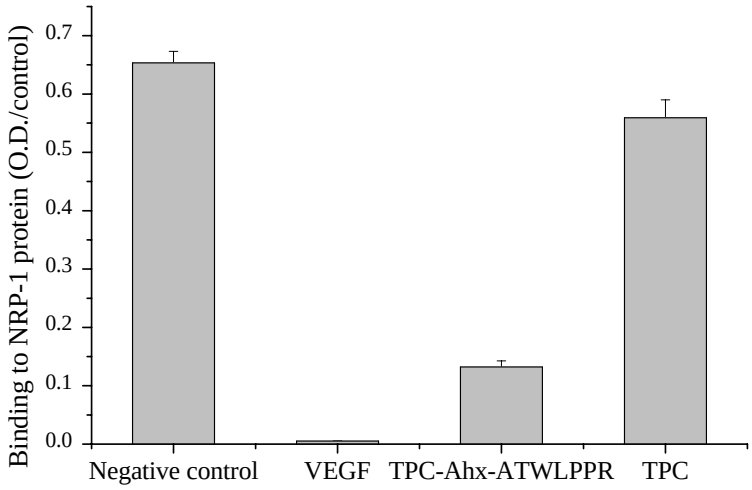


Figure 1. Binding of TPC and TPC-Ahx-ATWLPPR to NRP-1 protein. Binding of biotinylated VEGF (5 ng/mL ; 110 pM) to recombinant chimeric NRP-1 protein in the presence of 2 µg/mL heparin was evaluated without any addition as negative control, in the presence of VEGF as positive control (0.5 µg/mL), TPC (1 mM), or TPC-Ahx-ATWLPPR (1 mM). Data points show the mean ± s.d., $n = 3$.

3.2. NRP-1 knockdown leads to a decrease in TPC-Ahx-ATWLPPR cellular uptake

To precise the role of NRP-1 receptor in the cellular uptake of the conjugated PS, we applied RNA interference technology to knockdown the overexpression of NRP-1 protein in the wild-type (WT) MDA-MB-231 cells. SiRNA, targeting a sequence of NRP-1 mRNA, was transfected into WT cells and the NRP-1 protein level was analyzed by immunoblotting (Fig. 2c). SiRNA was able to decrease the protein expression of NRP-1. The selected clone exhibited approximately 2.3-fold lower NRP-1 protein expression than the control WT. No significant difference was observed between MDA-MB-231 WT cells and MDA-MB-231 cells transfected with the scrambled siRNA (Fig. 2c). The decrease in protein expression was also associated with a decrease in the level of mRNA in NRP-1 siRNA cells which display a 1.8-fold decrease in NRP-1 relative expression ratio (RER; Fig. 2a and 2b).

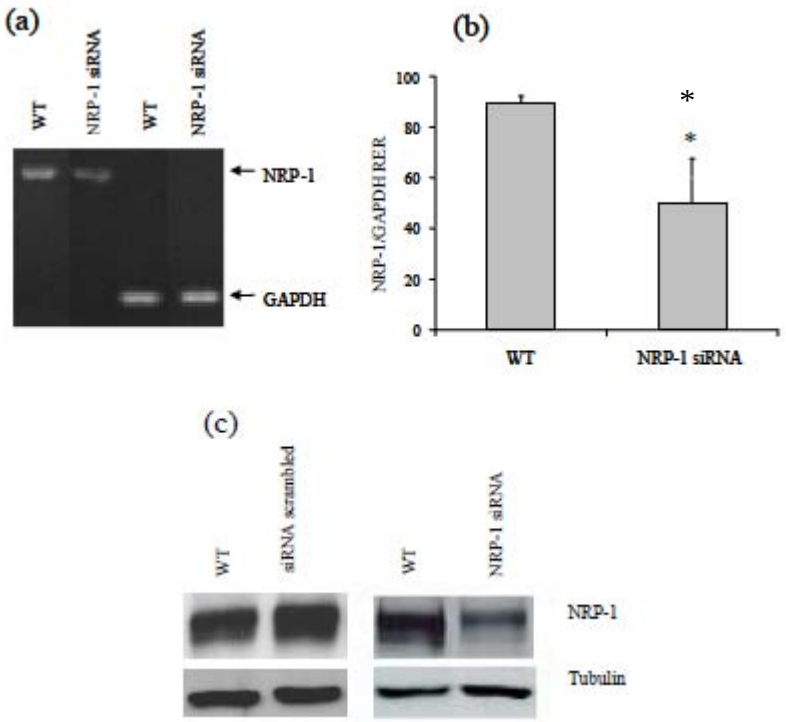


Figure 2. Reduced expression of NRP-1 by siRNA in wild-type MDA-MB-231 cells (WT) and in MDA-MB-231 NRP-1 siRNA cells (NRP-1 siRNA). (a) Total RNA was extracted from cells, then subjected to semi quantitative RT-PCR analysis. The relative levels of NRP-1 mRNA were normalized to those of GAPDH mRNA. (b) Relative band intensities for RT-PCR were quantified by densitometry. Data from RT-PCR analysis are expressed as the ratio for NRP-1 mRNA levels/GAPDH mRNA levels. (Data bars show the mean ± s.d., n = 3). Statistically significant difference from the RER values for WT cells and NRP-1 siRNA is indicated. *, P<0.05. (c) Proteins were analyzed in the total protein extracted from cells by Western blot, using either a tubulin or NRP-1-specific polyclonal antibody. Results are representative of three independent experiments.

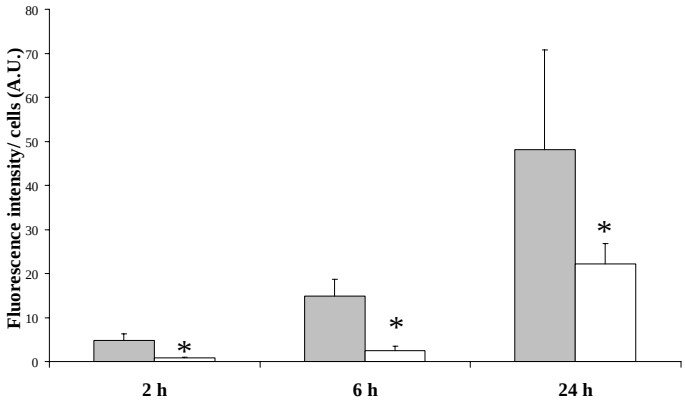


Figure 3. Uptake of TPC-Ahx-ATWLPPR in wild-type MDA-MB-231 cells (grey bars) and in MDA-MB-231 NRP-1 siRNA cells (white bars) according to incubation times. Cells were incubated with the PS at 5.0 µM. Cellular fluorescence intensities after extraction were measured at 652 nm following excitation at 415 nm (data points show the mean ± s.d., n = 12). *, P < 0.05.

The cellular uptake of TPC, used as a reference, and of TPC-Ahx-ATWLPPR, was examined at a non-cytotoxic concentration of 5.0 µM [7]. A statistically significant decrease of TPC-Ahx-ATWLPPR cellular uptake after RNA interference-mediated silencing of NRP-1 was evidenced only for the conjugated PS (Fig. 3).

3.3. VEGF plasma levels can not hinder the recognition of TPC-Ahx-ATWLPPR by NRP-1

In vivo, we evaluated VEGF plasma and tumor tissue concentrations in nude mice xenografted with U87 human malignant glioma cells. As the tumor model used human cancer cells, we performed experiments using different ELISA tests, detecting human VEGF (secreted by U87 tumor cells) and murine VEGF (secreted by host cells, *e.g.* macrophages) (Table 1). Plasma concentrations of VEGF (165 and 121 isoforms) were around 25 pg/mL (0.5 to 0.7 pM) lower than K_d values (K_d ~ 10-700 pM), considering a molecular weight of 35 and 45 kDa for $VEGF_{121}$ and $VEGF_{165}$ homodimers, respectively.

Table 1. Diffusible VEGF concentrations (human and murine) in plasma and in tumor tissue.

	Plasma (pg/mL)	**Tumor (pg/mg of proteins)**
Murine	25 ± 5 (n=4)*	3 (n=2)
Human	23 ± 36 (n=4)	330 ± 460 (n=4)

* Mean ± S.D., number of independent experiments

3.4. Intra tumor colocalization with endothelial cells

At four hours post-injection, TPC-Ahx-ATWLPPR was mostly colocalized in the endothelial cells lining the tumor vasculature (Fig. 4) whereas, at earlier times, it was mainly located in the blood compartment. As the endothelial angiogenic cells are the intended targets, these tumor data supported an irradiation time in the first hours post-i.v. injection of TPC-Ahx-ATWLPPR in order to take advantage of maximal concentrations of the PS in the endothelium.

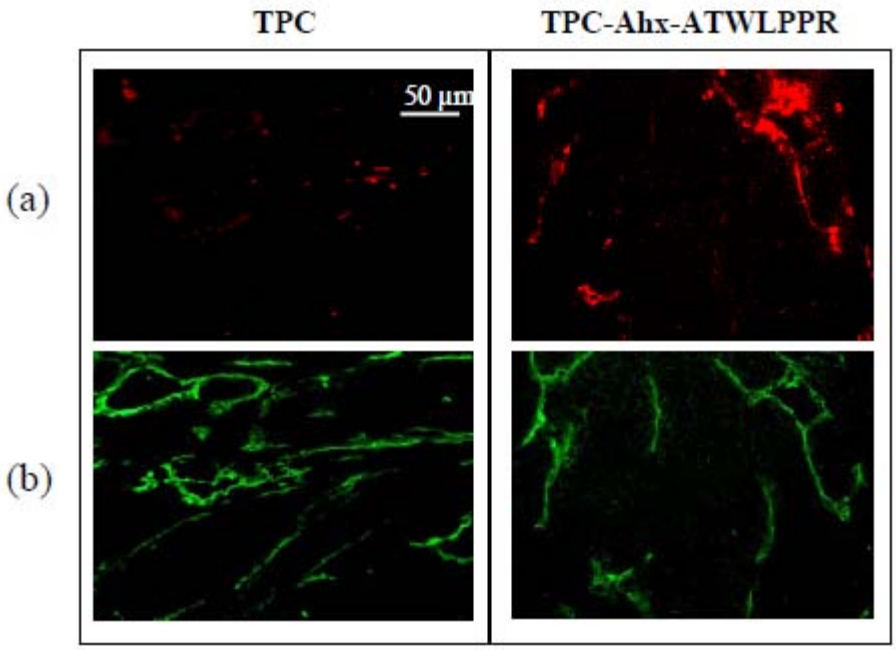


Figure 4. Intra-tumoral colocalization of the PSs 4 h after the intravenous injection. (a) Color composite image of TPC or TPC-Ahx-ATWLPPR fluorescence [red]. (b) Color composite image of CD31-staining [green] in the same region as (a). Analysis of the tumor sections after the conjugated PS administration showed that it was mainly colocalized inside the vascular endothelium. Results are representative of two independent experiments.

3.5. Vascular-targeted PDT efficiency in vivo

Vascular-targeted PDT (VTP) conditions were optimized for TPC-Ahx-ATWLPPR to promote the vascular-effect. Using optimal VTP condition deduced from response surface methodology, tumor growth curves following treatment with TPC-Ahx-ATWLPPR were compared to growth curves with the non conjugated PS [11]. Photosensitizer dose was 1.75 µmol/kg for both TPC and TPC-Ahx-ATWLPPR. Control groups (*i.e.* light only, TPC only and TPC-Ahx-ATWLPPR only) were also used ; no significant difference could be observed between these groups. Therefore the light-only control group was represented (Fig. 5). Under the PDT conditions optimized for TPC-Ahx-ATWLPPR, no significant difference could be observed between the control group and the TPC-treated group. On the contrary, mice treated by PDT with TPC-Ahx-ATWLPPR showed a statistically significant efficacy, compared to the TPC-treated group (Fig. 5).

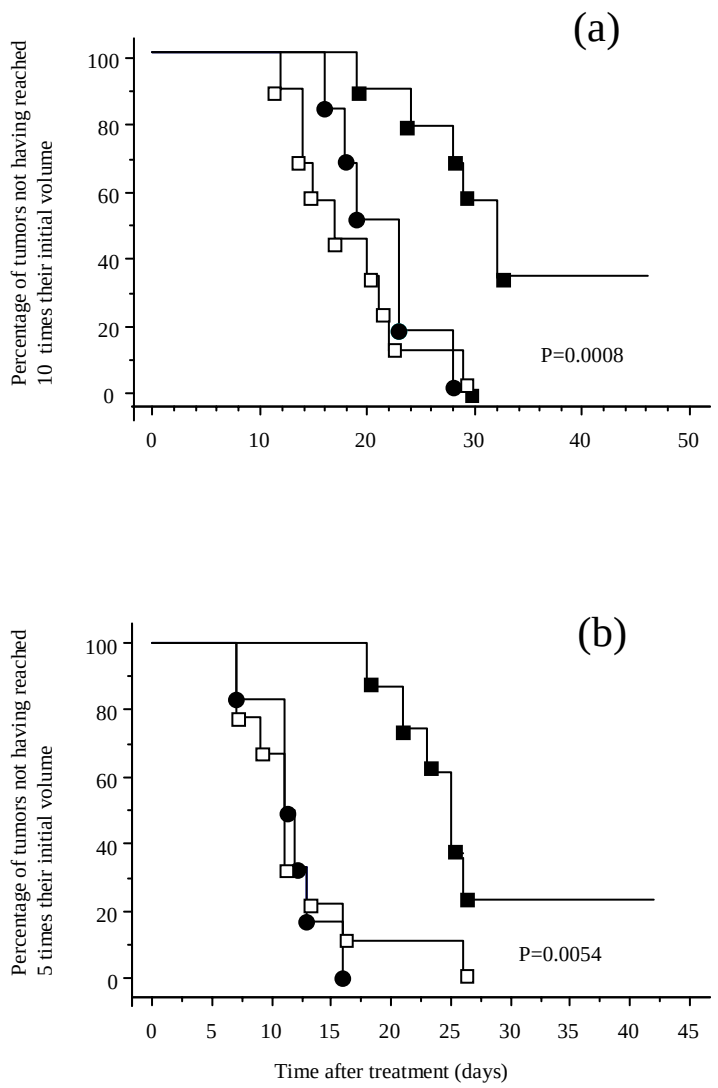


Figure 5. Kaplan-Meier curves of U87 tumors of control mice (no PS, light only) [*black circles*] or mice treated by PDT, using TPC [*white squares*] or TPC-Ahx-ATWLPPR [*black squares*] (a) considering the percentage of tumors not having reached 5 times, (b) 10 times, their initial volume at the end point. PDT conditions using RSM (fluence rate=85 mW/cm^2, fluence=120 J/cm^2, PS dose=1.75 µmol/kg). *Bars*, ± standard deviation (n=10, for each experimental group). Statistical analysis was performed using the log-rank test (*p* values represent comparison TPC *versus* TPC-Ahx-ATWLPPR).

3.6. Tumor blood flow decreases significantly during PDT

According to its intra-tumoral colocalization with endothelial cells 4 h post-injection, TPC-Ahx-ATWLPPR-mediated VTP produced selective vascular effects, including vasoconstriction. Tumor blood flow offers the advantage of continuous blood flow monitoring during PDT. It was measured continuously from 10 min before the start of PDT treatment until 15 min after the conclusion of PDT. Traces of blood flow during PDT of animals with both PSs are shown in Figure 6. In TPC-Ahx-ATWLPPR-PDT treated animals a rapid

increase in blood flow occurred during the first 3 min of treatment (Fig. 6). For each one of the four animals followed this increase was detected. The peak occurred within the first 5 min of PDT and only with the conjugated PS. Following this PDT-induced increase, blood flow decreased at about 50% of baseline, resulting in a characteristic biphasic change in tumor blood flow [16,17]. The first minimum was reached at about 10 min after the start of treatment, but the time to the trough varied widely among tumors. With TPC-mediated PDT as control, minor fluctuations in red blood flow were detected during illumination (Fig. 6).

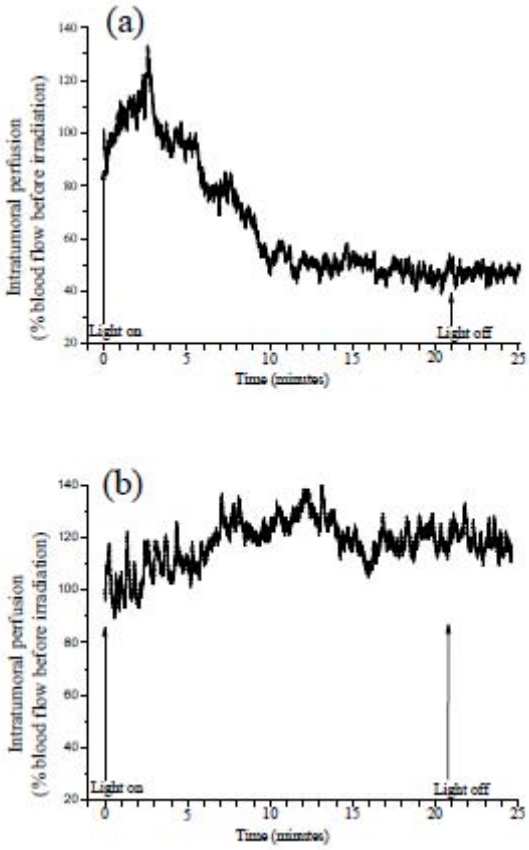


Figure 6. Averaged traces of blood flow in PDT-treated tumors (fluence rate=85 mW/cm^2, fluence=120 J/cm^2, PS dose=1.75 µmol/kg) (a) with TPC-Ahx-ATWLPPR, or (b) withTPC. Vertical lines indicated the beginning of PDT treatment (light on) and the end of PDT treatment (light off), respectively. Results are representative of four independent experiments.

4. Discussion

We previously demonstrated by binding and competition experiments that the heptapeptide displace $VEGF_{165}$ binding to NRP-1 [7]. The direct binding of ATWLPPR to NRP-1 has been also shown by Starzec *et al.* [18]. It should be noticed that conjugation with the spacer alone did not interfere with ATWLPPR binding on NRP-1, which was not surprising, since coupling at the amino-terminus of ATWLPPR has already been shown to be non-detrimental to ATWLPPR affinity for NRP-1 [19]. At first, ATWLPPR was described as specific for KDR [20]. ATWLPPR has initially been identified by screening a phage epitope library for affinity to an anti-$VEGF_{165}$ neutralizing monoclonal antibody, that was considered to mimic the $VEGF_{165}$ binding site on KDR. The cell line used (KDR-expressing CHO cells) had in fact lost expression of KDR, but constitutively expressed NRP-1 as shown later [18].

As previously described with HUVEC [7], a decrease of TPC intra-cellular accumulation *versus* TPC-Ahx-ATWLPPR was also observed in MDA-MB-231 cells strongly expressed NRP-1. In order to precisely determine the part of the increased uptake of TPC-Ahx-ATWLPPR related to NRP-1-dependent mechanisms *versus* non-NRP-1-dependent mechanisms, we used RNA interference-mediated silencing of NRP-1 in MDA-MB-231 cells. We evidenced a significant decrease of TPC-Ahx-ATWLPPR uptake after RNAi-mediated silencing of NRP-1 with no impact for TPC, which confirms the involvement of NRP-1 in TPC-Ahx-ATWLPPR cellular accumulation.

Our goal is to promote the vascular effect of PDT, which is thought to play a major part in tumor eradication [21] and, to do so, we aim at developing PS which could target endothelial cells of angiogenic tumor vessels. We previously undertook biodistribution studies on nude mice to assess the uptake of TPC-Ahx-ATWLPPR into different organs and subcutaneously xenografted U87 human malignant glioma, its elimination rate and its *in vivo* stability [9]. The time of 4 h post-injection corresponded, according to microscopy analyses, to highest incorporation of the conjugated PS in endothelial cells (before that time, *e.g.* at 1 h post-injection, the conjugate was mostly localized in the plasma). Conversely, TPC showed only faint and diffuse staining in the tumor, with no specific localization in endothelial cells.
In vivo, we determined VEGF plasma and tumor levels in nude mice xenografted with U87 cells. $VEGF_{121}$ et $VEGF_{165}$ intra-tumor concentrations measured (330±460 pg/mg of proteins) are comparable with the literature [22]. Plasma concentrations (121 and 165 isoforms) were lower than K_d values. Hence, the level of $VEGF_{165}$ in the blood compartment can not hinder the recognition of TPC-Ahx-ATWLPPR by NRP-1.

The antivascular effect of Photofrin®-mediated PDT has been studied [23], and many second generation PSs also create prominent vascular responses [24]. Both invasive and non invasive methods for investigating vascular damage during or after PDT include intravital microscopy, laser Doppler [16,25], power Doppler and optical coherence tomography [26]. To evaluate the relation between tumor blood flow during VTP and the type of PS used (targeted or not), we characterized blood flow during treatment by the flow reduction rate after the initial PDT-induced peak in flow. Few others have followed blood flow during PDT. Studies by Pogue *et al.* using laser Doppler between light fractions detected PDT-induced average decreases in blood flow [25]. Fingar *et al.* used intravital microscopy to measure constriction of the arteries of rat muscle treated with Photofrin®-PDT [23]. TPC-Ahx-ATWLPPR-mediated PDT produced a vascular effect during treatment, including as in many instance, an initial treatment-induced increase in tumor blood flow followed by a reduction in blood flow. Variations of the same magnitude were found in the blood flow of light-treated control animals and TPC-mediated PDT and only small increases in tumor temperature (<2.0°C) were measured during PDT with both PSs. We suggest transient increases in blood flow upon illumination may be a physiologic response to hypoxia created by photochemical oxygen consumption. Indeed, it is known that hypoxia initiates vasodilatation in the systemic arteries of normal tissues [27].

The conjugate-mediated VTP produces a selective vascular effect, leading to vascular shutdown and tumor growth delay. Treatment of glioma-bearing mice with the peptide-conjugated TPC showed a statistically significant reduction in tumor growth compared with animals who received PDT with TPC.

In summary, the targeting strategy, using a peptide competing with $VEGF_{165}$ binding on NRP-1, leads to a selective accumulation in endothelial cells lining tumor vessels. We evidenced that this conjugated-PS cellular uptake was related to modification in expression level of NRP-1 receptor. Antivascular response with the conjugate occurred rapidly, results in an interesting tumor growth delay and suggests novel approaches for tumor treatment with VTP. Nevertheless, using this approach, affinity for NRP-1 remains low and could be improved. Reasons for this may include, (i) intramolecular interactions between chlorin and peptide, and steric hindrance due to the TPC moiety, (ii) aggregation of the PS molecules. The conception of peptide-targeted delivery system would lead to an improvement of affinity.

References

[1] G.M. Tozer, R. Bicknell, Therapeutic targeting of the tumor vasculature, Semin Radiat Oncol 14(3) 2004 222-232.
[2] G.M. Tozer, C. Kanthou, B.C. Baguley, Disrupting tumour blood vessels, Nat Rev Cancer 5(6) 2005 423-435.
[3] J. Folkman, Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, Nat Med 1(1) 1995 27-31.
[4] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, Photodynamic therapy, J Natl Cancer Inst 90(12) 1998 889-905.
[5] R.A. Weersink, A. Bogaards, M. Gertner, S.R. Davidson, K. Zhang, G. Netchev, J. Trachtenberg, B.C. Wilson, Techniques for delivery and monitoring of TOOKAD (WST09)-mediated photodynamic therapy of the prostate: clinical experience and practicalities, J Photochem Photobiol B 79(3) 2005 211-222.
[6] R.A. Brekken, C. Li, S. Kumar, Strategies for vascular targeting in tumors, Int J Cancer 100(2) 2002 123-130.
[7] L. Tirand, C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, E. Trinquet, S. Pinel, M.L. Viriot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells, J Control Release 111(1-2) 2006 153-164.
[8] L. Tirand, N. Thomas, M. Dodeller, D. Dumas, C. Frochot, B. Maunit, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Metabolic profile of a Peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: an in vivo and in vitro study, Drug Metab Dispos 35(5) 2007 806-813.
[9] N. Thomas, L. Tirand, E. Chatelut, F. Plenat, C. Frochot, M. Dodeller, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice, Photochem Photobiol Sci 7(4) 2008 433-441.
[10] B.C. Wilson, M.S. Patterson, The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy, Phys Med Biol 53(9) 2008 61-109.
[11] L. Tirand, T. Bastogne, D. Bechet, M. Linder, N. Thomas, C. Frochot, F. Guillemin, M. Barberi-Heyob, Response surface methodology : an extensive potential to optimize in vivo photodynamic therapy conditions Int J Radiat Oncol Biol Phys in press 2009.
[12] Z. Kattan, S. Marchal, E. Brunner, C. Ramacci, A. Leroux, J.L. Merlin, L. Domenjoud, M. Dauca, P. Becuwe, Damaged DNA binding protein 2 plays a role in breast cancer cell growth, PLoS ONE 3(4) 2008 e2002.
[13] R.E. Bachelder, E.A. Lipscomb, X. Lin, M.A. Wendt, N.H. Chadborn, B.J. Eickholt, A.M. Mercurio, Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells, Cancer Res 63(17) 2003 5230-5233.
[14] A. Bianchi, P. Becuwe, P. Franck, M. Dauca, Induction of MnSOD gene by arachidonic acid is mediated by reactive oxygen species and p38 MAPK signaling pathway in human HepG2 hepatoma cells, Free Radic Biol Med 32(11) 2002 1132-1142.
[15] S. Pinel, M. Barberi-Heyob, E. Cohen-Jonathan, J.L. Merlin, C. Delmas, F. Plenat, P. Chastagner, Erythropoietin-induced reduction of hypoxia before and during fractionated irradiation contributes to improvement of radioresponse in human glioma xenografts, Int J Radiat Oncol Biol Phys 59(1) 2004 250-259.
[16] D.K. Kelleher, O. Thews, A. Scherz, Y. Salomon, P. Vaupel, Perfusion, oxygenation status and growth of experimental tumors upon photodynamic therapy with Pd-bacteriopheophorbide, Int J Oncol 24(6) 2004 1505-1511.
[17] G. Yu, T. Durduran, C. Zhou, H.W. Wang, M.E. Putt, H.M. Saunders, C.M. Sehgal, E. Glatstein, A.G. Yodh, T.M. Busch, Noninvasive monitoring of murine tumor blood flow during and after photodynamic therapy provides early assessment of therapeutic efficacy, Clin Cancer Res 11(9) 2005 3543-3552.
[18] A. Starzec, R. Vassy, A. Martin, M. Lecouvey, M. Di Benedetto, M. Crepin, G.Y. Perret, Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1, Life Sci 79(25) 2006 2370-2381.
[19] G.Y. Perret, A. Starzec, N. Hauet, J. Vergote, M. Le Pecheur, R. Vassy, G. Leger, K.A. Verbeke, G. Bormans, P. Nicolas, A.M. Verbruggen, J.L. Moretti, In vitro evaluation and biodistribution of a 99mTc-labeled anti-VEGF peptide targeting neuropilin-1, Nucl Med Biol 31(5) 2004 575-581.
[20] R. Binetruy-Tournaire, C. Demangel, B. Malavaud, R. Vassy, S. Rouyre, M. Kraemer, J. Plouet, C. Derbin, G. Perret, J.C. Mazie, Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis, Embo J 19(7) 2000 1525-1533.
[21] K. Ichikawa, T. Hikita, N. Maeda, S. Yonezawa, Y. Takeuchi, T. Asai, Y. Namba, N. Oku, Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels, Biochim Biophys Acta 1669(1) 2005 69-74.

[22] A. Ferrario, K.F. von Tiehl, N. Rucker, M.A. Schwarz, P.S. Gill, C.J. Gomer, Antiangiogenic treatment enhances photodynamic therapy responsiveness in a mouse mammary carcinoma, Cancer Res 60(15) 2000 4066-4069.
[23] V.H. Fingar, T.J. Wieman, S.A. Wiehle, P.B. Cerrito, The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion, Cancer Res 52(18) 1992 4914-4921.
[24] G.M. Garbo, M.G. Vicente, V. Fingar, D. Kessel, Effects of ursodeoxycholic acid on photodynamic therapy in a murine tumor model, Photochem Photobiol 78(4) 2003 407-410.
[25] B.W. Pogue, R.D. Braun, J.L. Lanzen, C. Erickson, M.W. Dewhirst, Analysis of the heterogeneity of pO2 dynamics during photodynamic therapy with verteporfin, Photochem Photobiol 74(5) 2001 700-706.
[26] Z. Chen, T.E. Milner, X. Wang, S. Srinivas, J.S. Nelson, Optical Doppler tomography: imaging in vivo blood flow dynamics following pharmacological intervention and photodynamic therapy, Photochem Photobiol 67(1) 1998 56-60.
[27] R.M. Leach, H.S. Hill, V.A. Snetkov, J.P. Ward, Hypoxia, energy state and pulmonary vasomotor tone, Respir Physiol Neurobiol 132(1) 2002 55-67.

Stabilité in vitro *et* in vivo *de la TPC-Ahx-ATWLPPR*

Chapitre III : Stabilité in vitro et in vivo
de la TPC-Ahx-ATWLPPR

I. Résumé

La TPC-Ahx-ATWLPPR s'est révélée stable dans le plasma humain et le plasma de souris *in vitro* à 37°C, pendant 48 h. *In vivo,* aucune dégradation n'est observée dans le plasma pendant 4 h, puis la portion peptidique se dégrade progressivement, pour former TPC-Ahx-A (caractérisé par spectrométrie de masse MALDI-TOF et suivi en HPLC). Après 48 h d'incubation *in vitro* avec des HUVEC, la TPC-Ahx-ATWLPPR n'est pas dégradée dans le milieu extracellulaire. En revanche, nous avons noté l'apparition, suite à son incorporation intracellulaire, d'un produit de dégradation principal, **TPC-Ahx-A**, identique au produit de dégradation retrouvé *in vivo,* mais également de deux produits de dégradation secondaires (TPC-Ahx-AT et TPC-Ahx-ATWLPP). Cette dégradation enzymatique résulte majoritairement des **peptidases lysosomales**. Nous avons préalablement identifié, par colocalisation avec divers marqueurs fluorescents d'organites et visualisation par microscopie confocale, les lysosomes comme étant le site de localisation préférentielle de la TPC-Ahx-ATWLPPR. *In fine,* notre composé apparaît **relativement stable** comparé à certains peptides présentant des temps de demi-vie limités à quelques minutes. Dans notre cas, la dégradation observée suite à l'incorporation n'est pas gênante pour notre stratégie.

II. "Metabolic Profile of a Peptide-Conjugated Chlorin-Type Photosensitizer Targeting Neuropilin-1: An *in Vivo* and *in Vitro* Study"

Tirand L., **Thomas N**., Dodeller M., Dumas D., Frochot C., Maunit B., Guillemin F., Barberi-Heyob M.

Drug Metab Dispos, 2007, 35(5):806-13.

Metabolic Profile of a Peptide-Conjugated Chlorin-Type Photosensitizer Targeting Neuropilin-1: An in Vivo and in Vitro Study

Loraine Tirand, Noémie Thomas, Marc Dodeller, Dominique Dumas, Céline Frochot, Benoît Maunit, François Guillemin, and Muriel Barberi-Heyob

Centre Alexis Vautrin-CRAN, Unité Mixte de Recherche 7039 Centre National de la Recherche Scientifique-UHP-INPL Nancy-University, Vandoevre-lès-Nancy, France (L.T., N.T., F.G., M.B.-H.); Laboratoire de Mécanique et Ingénierie Cellulaire et Tissulaire, Unité Mixte de Recherche 7563 Centre National de la Recherche Scientifique-INPL, LEMTA et IFR 111 Centre National de la Recherche Scientifique-UHP-INPL-CHU (D.D.), Nancy-University, Vandœuvre-lès-Nancy, France; Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, Université Paul Verlaine-Metz, Metz, France (M.D., B.M.); and DCPR-GRAPP, Groupe ENSIC-Unité Mixte de Recherche 7630 Centre National de la Recherche Scientifique-INPL, Nancy-University, Nancy, France (C.F.)

Received November 8, 2006; accepted February 2, 2007

ABSTRACT:

Because angiogenic endothelial cells of the tumor vasculature represent an interesting target to potentiate the antivascular effect of photodynamic therapy, we recently described the conjugation of a photosensitizer [5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin (TPC)], via a spacer [6-aminohexanoic acid (Ahx)], to a vascular endothelial growth factor receptor-specific heptapeptide [H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH (ATWLPPR)] and showed that TPC-Ahx-ATWLPPR binds to neuropilin-1. Because peptides often display low stability in biological fluids, we examined the in vivo and in vitro stability of this conjugate by high-performance liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight mass spectrometry. TPC-Ahx-ATWLPPR was stable in vitro in human and mouse plasma for at least 24 h at 37°C but, following i.v. injection in glioma-bearing nude mice, was degraded in vivo to various rates, depending on the organ considered. TPC-Ahx-A was identified as the main metabolic product, and biodistribution studies suggested that its appearance in plasma mainly resulted from the degradation of the peptidic moiety into organs of the reticuloendothelial system. According to in vitro cell culture experiments, TPC-Ahx-ATWLPPR was also significantly degraded after incorporation in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), mainly into TPC-Ahx-A and to a lesser extent into TPC-Ahx-AT and TPC-Ahx-ATWLPP. TPC-Ahx-ATWLPPR mostly localized into lysosomes, and when HUVEC were treated with the lysosomal enzymes' inhibitor ammonium chloride, this resulted in a significant decrease of the peptide degradation. This study provides essential information for the choice of the time of activation of the photosensitizer (drug-light interval) not to be exceeded and for the future design of more stable molecules.

The selectivity of photodynamic therapy (PDT) as an anticancer treatment relies on the local generation of cytotoxic reactive oxygen species in the tumor as a result of both preferential uptake of the photosensitizer (PS) by malignant tissue and subsequent localized light irradiation. Indeed, the PS, at the concentrations used for PDT, is nontoxic in the dark and becomes photocytotoxic only when light at an appropriate wavelength is applied. However, the tumor selectivity of PS used in the clinic is limited because they tend to accumulate in normal tissue (Dougherty et al., 1998). This can be improved by using third-generation PS, which consist of PS to which a tumor-targeting moiety is attached (Sharman et al., 2004). Among these tumor-targeting molecules, peptides are receiving increasing interest in the field of PDT (Schneider et al., 2006). They not only exist in a natural form but also can be designed synthetically as novel molecules. In addition, the effective tissue penetration of short synthetic peptides in combination with their selective binding and internalizing capacity by cancer cells make peptides ideal candidates for the delivery of therapeutic agents such as PS (Schneider et al., 2006).

We recently reported the synthesis and in vitro efficacy of a new peptide-conjugated PS (referred to hereafter as TPC-Ahx-ATWLPPR) having affinity for endothelial cells of the tumor neovasculature by

This work was supported by the research funds of the French "Ligue Nationale Contre le Cancer, Comités Lorrains."

This work was presented in part at the 97th Annual Meeting of the American Association for Cancer Research, Washington, DC, April 1–5, 2006.

Article, publication date, and citation information can be found at http://dmd.aspetjournals.org.

doi:10.1124/dmd.106.013763.

ABBREVIATIONS: PDT, photodynamic therapy; PS, photosensitizer(s); TPC, 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin; Ahx, 6-aminohexanoic acid; ATWLPPR, H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH; VEGF, vascular endothelial growth factor; NRP-1, neuropilin-1; MALDI-TOF, matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight; HPLC, high-performance liquid chromatography; HUVEC, human umbilical vein endothelial cell(s); Fmoc, 9-fluorenyl-methoxy-carbonyl; PBS, phosphate-buffered saline; EGM, endothelial growth medium; PEG, polyethylene glycol; *m*THPP, 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)porphyrin; p.i., postinjection; DLI, drug-light interval; LDL, low-density lipoprotein(s).

targeting the vascular endothelial growth factor ($VEGF_{165}$) receptor neuropilin-1 (NRP-1) and not the type 2 VEGF receptor (VEGFR2/KDR), as previously thought, through its peptidic moiety (Tirand et al., 2006). TPC-Ahx-ATWLPPR displayed enhanced uptake and photodynamic properties in endothelial cells compared with its nonconjugated counterpart TPC. Destruction of the neovasculature of tumors may indirectly lead to tumor eradication, following deprivation of life-sustaining nutrients and oxygen (Folkman, 1995; Dougherty et al., 1998), and this antivascular effect is thought to play a major part in the destruction of some vascularized tumors by PDT (Ichikawa et al., 2005).

Despite their numerous advantages over other molecules (e.g., antibodies, proteins) as targeting agents, the main disadvantage of peptides is related to their natural structural conformation, which makes them extremely sensitive to endopeptidases and exopeptidases present in most tissues (Adessi and Soto, 2002). As a result, they often display low stability in biological fluids, which limits their use in vivo. Whereas the PS moiety of TPC-Ahx-ATWLPPR is responsible for the photocytotoxic activity of the conjugate, the peptidic part is responsible for its selectivity. Degradation of the peptidic moiety of the molecule would impair the selectivity of the conjugate and would both allow it to accumulate in normal tissues, where the activated PS could exert nondesirable photocytotoxicity, and decrease the amount of PS delivered to targeted diseased tissues. Therefore, to optimize the in vivo use of the new conjugate TPC-Ahx-ATWLPPR that proved very effective in vitro (Tirand et al., 2006), we sought to investigate its stability after i.v. injection to mice bearing NRP-1-expressing tumors. The metabolic products were identified and quantified by matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry and reverse-phase high-performance liquid chromatography (HPLC), respectively. Besides, to gain mechanistic insight in the degradation process observed in vivo, the in vitro stability of TPC-Ahx-ATWLPPR was studied in human and mouse plasma, as well as in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) that express NRP-1.

Materials and Methods

Synthesis and Purification. TPC was purchased from Frontier Scientific (Logan, UT). Wang resin, 9-fluorenyl-methoxy-carbonyl (Fmoc)-amino acids, and Fmoc-aminohexanoic acid were from Senn Chemicals International (Gentilly, France). The side chains of threonine and tryptophan were protected by tertio-butyl and *N-tert*-butoxy-carbonyl groups, respectively. The PS-peptide conjugate TPC-Ahx-ATWLPPR (Fig. 1) was synthesized on a multichannel peptide synthesizer according to a classical Fmoc/tertio-butyl solid-phase methodology and purified by reverse-phase HPLC, as described previously (Tirand et al., 2006). Stock solutions of 2 mM in dimethyl sulfoxide, aliquoted and kept in the dark at −20°C, were used.

Chemical Characterization. Purity and chemical identity of TPC-Ahx-ATWLPPR were assessed by HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry analyses, respectively, as described in corresponding paragraphs. Hydrophobicity/hydrophilicity properties of TPC-Ahx-ATWLPPR were determined using the distribution coefficient $D_{pH\ 7.4} = C_{octanol}/C_{PBS}$ of the compound between the two immiscible solvents *n*-octanol and phosphate-buffered saline (PBS), which had previously been presaturated with each other. TPC-Ahx-ATWLPPR was mixed with an equal volume of octanol (1.5 ml) and PBS (1.5 ml) at room temperature. The mixture was agitated during 3 h. When equilibrium between the two phases was achieved, the solvents were separated by centrifugation (2500*g*; 5 min). The amount of PS contained in each phase was determined by HPLC. The distribution coefficient $D_{pH\ 7.4}$ is expressed as log (mean ± S.D., $n = 6$).

Cell Line and Culture. For in vitro experiments, NRP-1-expressing HUVEC, pooled from several donors, were used (Cambrex, Verviers, Belgium) and routinely grown in endothelial growth medium (EGM2), as described previously (Tirand et al., 2006).

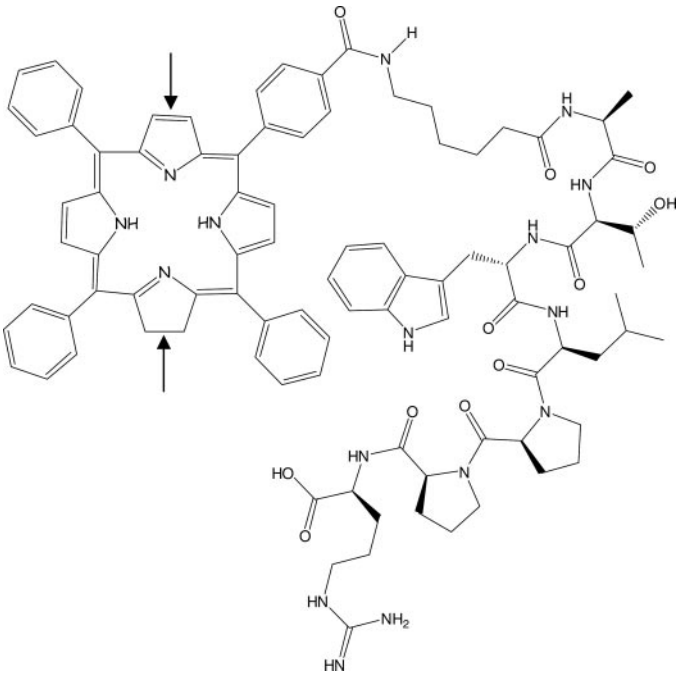


FIG. 1. Molecular structure of one of the isomers of the peptide-chlorin conjugate TPC-Ahx-ATWLPPR. Arrows indicate the two possible sites of double-bond reduction during synthesis of a chlorin from a porphyrin, leading to a mixture of two isomers.

Animals and Tumor Model. Female athymic Foxn1 nude mice (*nu/nu*) were obtained from Harlan (Gannat, France), were 7 to 9 weeks old, and weighed 20 to 25 g. Animal procedures were performed according to institutional and national guidelines. The model of human malignant glioma was obtained using U87 cells, as described previously (Tirand et al., 2006).

In Vivo Metabolism of TPC-Ahx-ATWLPPR. When tumors reached a volume of 70 ± 30 mm^3 (15 ± 5 days after tumor grafting), TPC-Ahx-ATWLPPR (2.8 mg/kg) dissolved in polyethylene glycol (PEG) 400/ethanol/water (30:20:50, v/v/v) was injected via the tail vein, and mice were kept in the dark. After a time ranging from 1 to 48 h, mice were anesthetized by i.p. injection of ketamine (Ketalar, Panpharma, Fougères, France) at 60 mg/kg and xylazine (Rompun, Bayer Pharma, Puteaux, France) at 8 mg/kg. Blood samples were collected in heparinized tubes (BD Vacutainer, Becton Dickinson, Plymouth, UK) by cardiac puncture and cooled on ice, and the plasma was separated by centrifugation (700*g*; 10 min) within 30 min of collection. Mice were sacrificed by cervical dislocation, and the tissues were carefully excised, rinsed with saline, and blotted dry. The tissues selected for dissection were tumor, liver, kidney, spleen, and skin (removed from the back of the mice). At least three animals were used per time point. All the samples were protected from light. Blood, tumor, and organ samples were kept at −80°C in polypropylene tubes until analysis by HPLC and/or MALDI-TOF mass spectrometry.

In Vitro Stability of TPC-Ahx-ATWLPPR. Human and mouse plasma were obtained from whole blood of human volunteers and nude mice, respectively. Mice and human blood samples were collected in heparinized tubes by heart puncture or using an indwelling i.v. cannula placed in the arm, respectively. After immediate centrifugation at 700*g* for 10 min at 4°C, the supernatant (plasma) was withdrawn and frozen at −80°C in aliquots until required. TPC-Ahx-ATWLPPR was added to prewarmed human or mouse plasma at a final concentration of 1 μM and incubated up to 24 h at 37°C. Samples were taken after 2, 6, and 24 h and kept at −80°C in polypropylene tubes until analysis by HPLC.

For in vitro cell experiments, HUVEC were grown in T-25 flasks (initial seeding concentration: 5.10^4 cells/ml) for 3 days. EGM2 medium (3 ml) containing 1 μM TPC-Ahx-ATWLPPR (with or without 30 mM ammonium chloride) (Merck Eurolab A.A., Fontenay-sous-Bois, France) was then added. At different times, ranging from 1 to 24 h, the EGM2 cell medium was collected. Subsequently, cells were rinsed twice with cold PBS, trypsinized, counted, centrifuged (220*g*; 5 min), and kept at −80°C in polypropylene tubes

until analysis by HPLC and/or MALDI-TOF mass spectrometry. All the incubations were performed in triplicate.

Preparation of Samples for HPLC and MALDI-TOF Mass Spectrometry Analyses. Extraction of the PS from plasma, tumor, organs, cells, and cell medium was carried out as described previously (Barberi-Heyob et al., 2004; Tirand et al., 2006). To remove surface blood, tissue samples (tumor, organs) were rinsed in physiological saline, blotted dry, and weighed. They were crushed in 500 μl of Tris EDTA molybdate buffer (10 mM Tris, 1.66 mM EDTA, 5 mM molybdate, pH 7.4) using an Ultra-Turrax T25 device (IKA, Labortechnik, Janke and Kunkel, Staufen, Germany). Then, all the samples were spiked with 100 μl of 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)porphyrin (*m*THPP) (500 ng/ml in methanol) as an internal standard of extraction. Extraction involved solvent precipitation using methanol combined with dimethyl sulfoxide (5:0.1, v/v). Samples were then vortexed, homogenized for 30 min, and sonicated for 10 min (Branson 1200, Roucaire Instruments Scientifiques, Les Ulis, France). Tissue and cellular debris were removed by centrifugation (2500*g*; 15 min). The PS-containing organic phase was then concentrated by evaporation at room temperature for at least 3 h with a Speedvac apparatus (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) and resuspended into 200 μl of methanol.

Control (blank) plasma, tumor, organs, cells, and cell medium (i.e., containing no exogenous PS) were used to determine whether endogenous constituents coeluted with the PS. Calibration samples, used to construct calibration curves, were prepared by mixing plasma, tumor, organs, cells, or cell medium with appropriate concentrations of PS. For these control and calibration samples, the PS extraction procedure was identical to that described above.

HPLC Analysis. The chromatographic system was composed of a programmable solvent module (System Gold 126, Beckman Coulter, Fullerton, CA), an autosampler injector (507e, System Gold, Beckman Coulter), and a scanning fluorescence detector (RF-10A XL, Shimadzu, Kyoto, Japan). Analyses were performed by reverse-phase HPLC on a C18 analytical column (250 $\times$ 4.6 mm i.d., S-5 μm, YMC, Interchim, Montluçon, France) under isocratic elution conditions with a mobile phase of methanol/H_2O (95:5, v/v) and a flow rate of 1 ml/min. Fluorescence emission was detected at 652 nm, with an excitation wavelength set at 416 nm. These wavelengths correspond to the maximal intensities of the fluorescence emission and absorption spectra of TPC-Ahx-ATWLPPR, respectively (Tirand et al., 2006). All the chemicals were of analytical grade quality. The chromatograms were acquired and analyzed using GOLD Nouveau software version 1.6 (Beckman Coulter). Quantitations were based on peak areas and deduced from calibration curves.

MALDI-TOF Mass Spectrometry Analysis. One microliter of a 2,5-dihydroxybenzoic acid solution (150 mg/ml in water/acetonitrile, 1:1, v/v) was mixed with 1 μl of sample and spotted on the stainless steel MALDI targets. The solvent was evaporated before insertion in the source. Mass spectra were acquired over the range 0 to 2000 Da. Analyses were performed on a Bruker Reflex IV TOF mass spectrometer (Bruker-Daltonic, Bremen, Germany) equipped with the SCOUT 384 probe ion source. The system used a pulsed nitrogen laser (337 nm, model VSL-337ND, Laser Science Inc., Boston, MA) with a maximal energy of 400 μJ/pulse. The detector signals were amplified and transferred to the XACQ program on a SUN workstation (Sun Microsystems Inc., Palo Alto, CA). Spectra were processed with the XMass 5.1 program (Bruker-Daltonic). External calibration of MALDI mass spectra was carried out using sodic and potassic distribution of PEG 600 and PEG 1500 mixtures.

Intracellular Localization by Confocal Laser Scanning Microscopy. Exponentially growing HUVEC were plated at 10^3 cells/well in Labtek-II eight-chambered coverslips (Dutscher, Brumath, France). After a 48-h attachment and growth period at 37°C, the cells were incubated with TPC-Ahx-ATWLPPR (1 μM) for 24 h and specific fluorescent organelle markers (Molecular Probes-Europe, Leiden, The Netherlands) using the procedure adapted from the experimental protocol previously reported (Di Stasio et al., 2005). The endoplasmic reticulum was stained by incubating cells for 30 s at room temperature with 1 μg/ml 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide. Mitochondria were identified after staining the cells for 30 min at 37°C with 0.5 μM MitoTracker Green (Molecular Probes, Eugene, OR). LysoTracker Green (Molecular Probes) was used at a final concentration of 0.2 μM for 30 min to identify lysosomes. To visualize the Golgi apparatus, cells were labeled with 2 μM *N*-(4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacene-3-pentanoyl) sphingosine (BODIPY FL C_5-ceramide) for 20 min at 4°C and then further incubated in dye-free EGM2 medium at 37°C for 30 min. At the end of the double staining, the labeling solution was removed by gentle rinsing with EGM2 medium, and cells were imaged using a confocal laser scanning microscope (TCS SP2-AOBS, Leica Microsystem, Wetzlar, Germany) equipped with a 63×, numerical aperture 1.3 oil immersion objective (Leica). A pinhole of 60.85 μm was used, and each image recorded contained 512 $\times$ 512 pixels. An argon laser was used as excitation light at 488 nm for all the organelle probes and TPC-Ahx-ATWLPPR. Fluorescence of the organelle probes was detected on channel 1 with a 505- to 545-nm band-pass emission filter. Channel 2 was used to detect the red fluorescence of TPC-Ahx-ATWLPPR with a 640- to 660-nm band-pass emission filter. The fluorescence images were displayed in green and red "false" colors for organelle markers and PS, respectively.

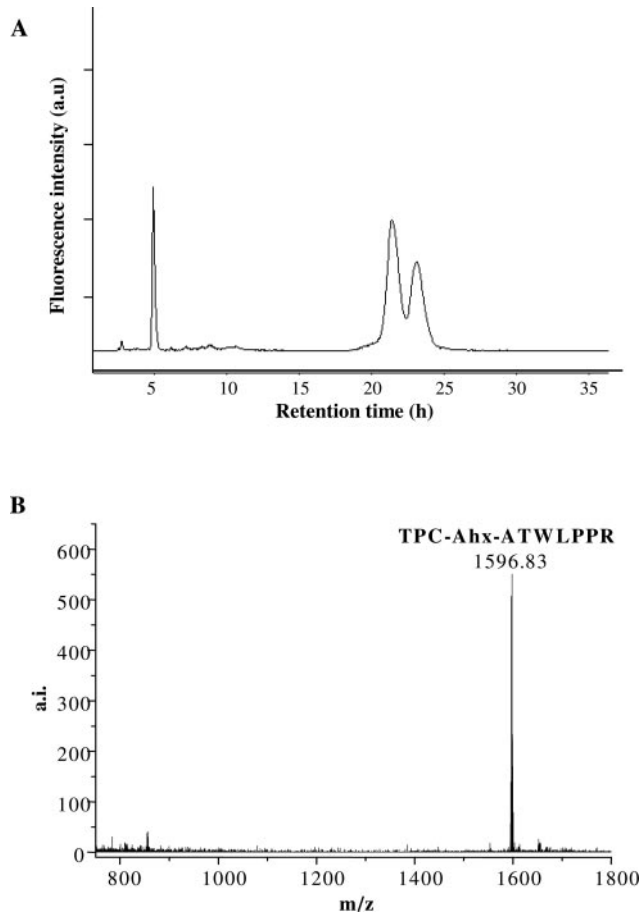


FIG. 2. A, HPLC chromatogram of TPC-Ahx-ATWLPPR (retention time, 21 $\pm$ 3 min) after synthesis and purification, supplemented with *m*THPP (retention time, 5 $\pm$ 1 min) as an internal standard. The two peaks corresponding to TPC-Ahx-ATWLPPR arise from the presence of two isomers of the molecule as a result of its asymmetrical character. B, MALDI-TOF mass spectrum of TPC-Ahx-ATWLPPR after synthesis and purification (theoretical mass = 1596.81 Da, experimental mass = 1596.83 Da).

Statistical Analysis. Unless otherwise indicated, all the data are mean values $\pm$ S.D. calculated from at least three independent experiments. Mann-Whitney *U* test was used to test for the significant level between independent variables. The level of significance was set to $p < 0.05$.

Results

Chemical Characterization of TPC-Ahx-ATWLPPR. The molecular structure of the conjugate TPC-Ahx-ATWLPPR is shown on Fig. 1. The peptide-conjugated chlorin was obtained with a final purity greater than 95%, as assessed by analytical reverse-phase HPLC (Fig. 2A). Several peaks can be observed on the chromatogram.

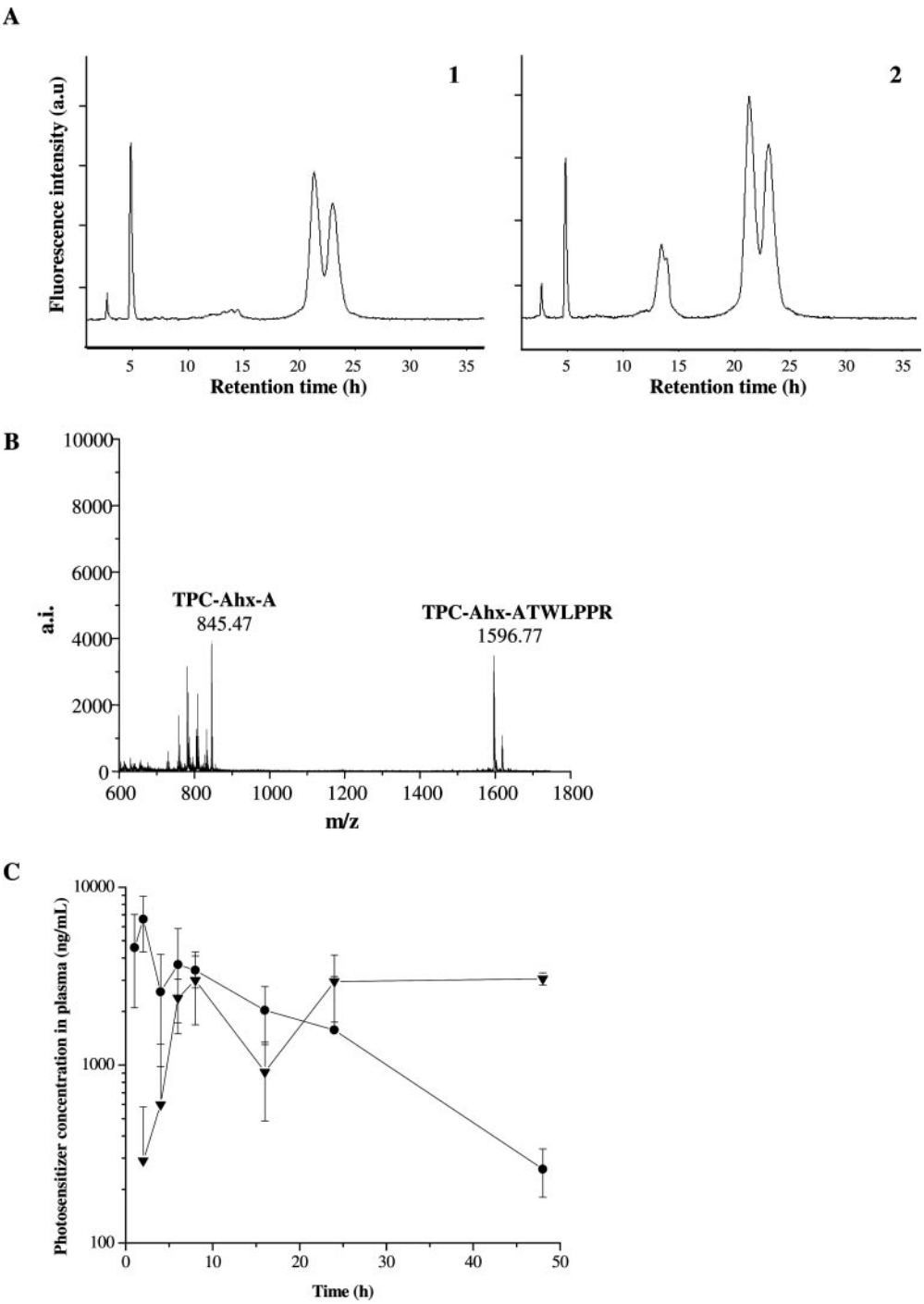


FIG. 3. A, representative HPLC chromatograms of plasma extracts 2 h (1) and 4 h (2) after i.v. administration of 2.8 mg/kg TPC-Ahx-ATWLPPR to glioma-bearing nude mice, supplemented with *m*THPP (retention time, 5 ± 1 min) as an internal standard. Peaks eluted at shorter times (12 ± 2 min) than TPC-Ahx-ATWLPPR (21 ± 3 min) appear on the chromatograms; their intensity increases as a function of the time after i.v. injection. For chromatographic conditions and extraction procedure, see under *Materials and Methods*. B, MALDI-TOF mass spectrum of plasma extracts 4 h p.i. C, in vivo plasma stability of TPC-Ahx-ATWLPPR in nude mice. Plasma concentrations, determined by HPLC, of TPC-Ahx-ATWLPPR (circle) and TPC-Ahx-A (triangle) are expressed as a function of time p.i. (data points show the mean ± S.D., $n \geq 3$).

The peak eluted at 5 ± 1 min corresponds to *m*THPP, used as an internal standard. The double peak with a retention time of about 21 min corresponds to TPC-Ahx-ATWLPPR. The two peaks arise from the presence of two isomers of the molecule, resulting from the reduction of a double bond on either opposing side of the tetrapyrrolic macrocycle. These isomers could also be observed in the commercial TPC used for synthesis. Identity was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry (theoretical mass = 1596.81 Da, experimental mass = 1596.83 Da) (Fig. 2B). The value of the octanol/PBS distribution coefficient log $D_{pH\ 7.4}$ was equal to 2.6 ± 0.2, arguing for the hydrophobic character of TPC-Ahx-ATWLPPR.

In Vivo Plasma Stability. No degradation product of TPC-Ahx-ATWLPPR could be observed in vivo in plasma up to 1 h after i.v. injection (not shown). From 2 h postinjection (p.i.), peaks with shorter retention times (12 ± 2 min) than those corresponding to TPC-Ahx-ATWLPPR (21 ± 3 min) appeared on the HPLC chromatograms of plasma and increased as a function of time after injection (Fig. 3, A1 and A2). We identified the predominant metabolic product as resulting from the enzymatic cleavage of the peptide bond between the alanyl and threonyl residues (Fig. 3B). This degradation product (TPC-Ahx-A) was detected in plasma at all the time points from 2 h p.i. (Fig. 3C). However, the amount of degradation product in plasma was relatively low (less than 20% of the total amount of PS) up to 4 h p.i.

In Vitro Stability in Plasma. To assess the involvement of the plasma compartment in the degradation process, we followed the in

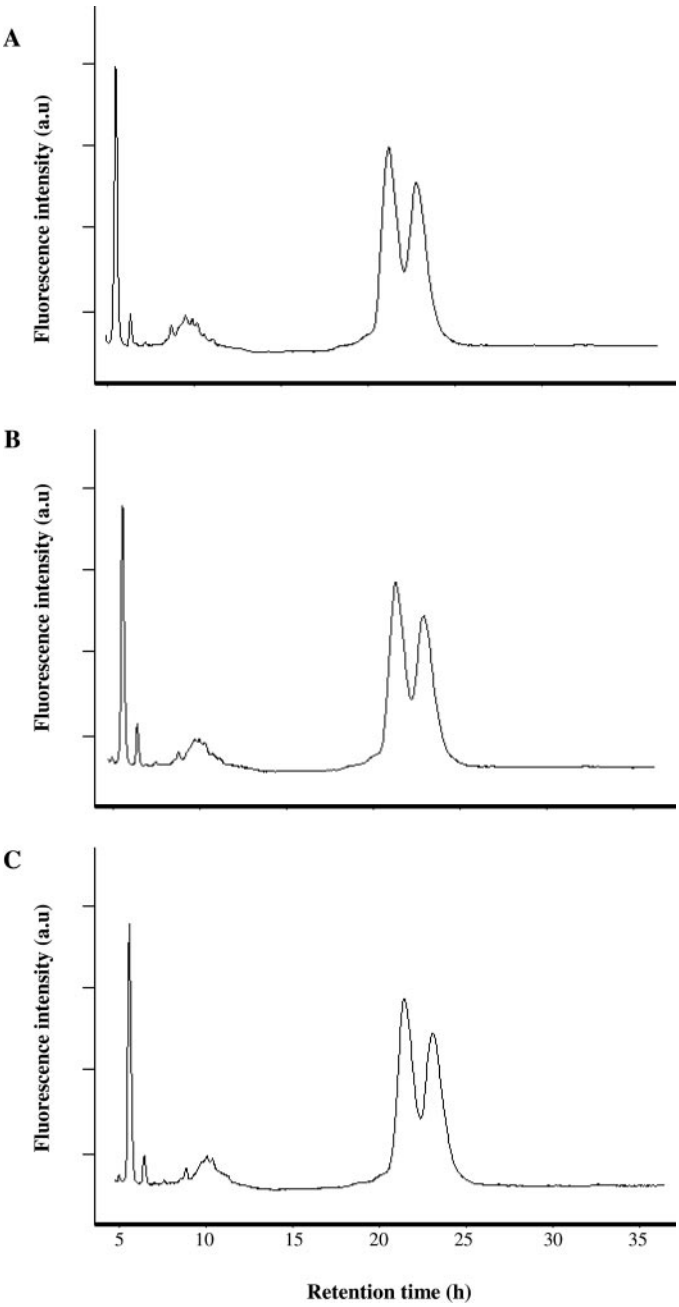


FIG. 4. Representative HPLC chromatograms of human plasma extracts following 2 h (A), 6 h (B), and 24 h (C) in vitro incubation at 37°C with TPC-Ahx-ATWLPPR (1 μM), supplemented with *m*THPP (retention time, 5 $\pm$ 1 min) as an internal standard.

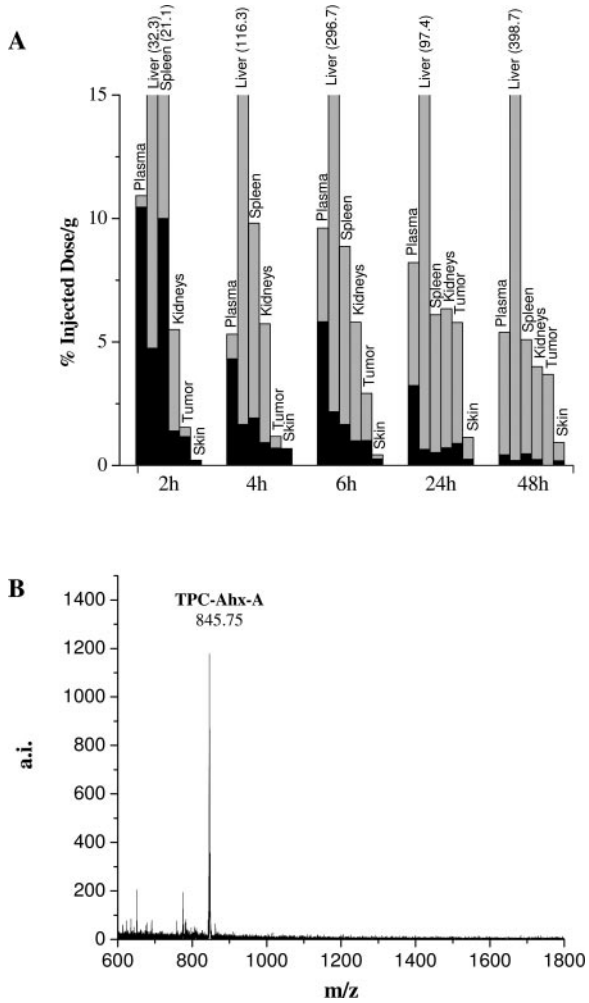


FIG. 5. A, biodistribution of the PS (black, TPC-Ahx-ATWLPPR; light gray, degradation product) in different organs, according to time after i.v. administration of 2.8 mg/kg TPC-Ahx-ATWLPPR in tumor-bearing mice. The data presented are the mean percentages of injected dose per gram of tissue ($n = 3$ or 4). Values were not corrected for blood content of the tissue. Some of the high levels of PS in liver and spleen are written in brackets at the top of the corresponding bars. PS in plasma and endogenous molecules (e.g., heme) account for a non-negligible part of the PS quantities estimated in the liver, a highly vascularized organ. B, MALDI-TOF mass spectrum of liver extract 24 h p.i. of TPC-Ahx-ATWLPPR.

vitro stability of TPC-Ahx-ATWLPPR in plasma. A concentration of 1 μM was chosen because it represents a relevant in vivo concentration. Indeed, after injection of 2.8 mg/kg TPC-Ahx-ATWLPPR in glioma-bearing mice, the in vivo plasma concentrations of this peptide-PS conjugate were in the range of 200 to 6000 ng/ml (0.1–3.8 μM) from 1 to 48 h p.i. (Fig. 3C). TPC-Ahx-ATWLPPR was stable in vitro in human plasma up to 24 h at 37°C (Fig. 4). Likewise, no degradation could be observed in mouse plasma up to 24 h in the same conditions (not shown). This suggested that the degradation observed in mouse plasma in vivo did not involve plasma peptidases.

In Vivo Biodistribution and Metabolism in Glioma-Bearing Nude Mice. To explore the biodistribution and stability of TPC-Ahx-ATWLPPR in tumor-bearing mice, PS concentrations were determined in the tumor and organs of mice ($n = 3$ or 4) at different times. Following i.v. injection into tumor-bearing mice, PS accumulated to the highest levels in liver and spleen (Fig. 5A). It should be noted that part of the PS quantities estimated in the liver, a highly vascularized organ, is caused by PS present in the blood circulation because our values have not been corrected for blood content of the tissue. Moreover, endogenous porphyrins (e.g., heme) are present at significant levels in the liver. These porphyrins could not be completely separated from our PS; indeed, part of their elution peaks superimposed to the ones of our PS (i.e., similar retention times). As a result, the real PS quantities in the liver are in fact lower than those presented in Fig. 5A but would remain much higher than the PS quantities in all the other organs considered. Total PS levels in the tumor were higher than in the skin at all the time points (Fig. 5A).

Whereas TPC-Ahx-ATWLPPR was stable in vitro in plasma for at least 24 h, a degradation product could be observed in vivo in plasma (Fig. 3A2), as well as in other organs (Fig. 5A). In the organs of the reticuloendothelial system, TPC-Ahx-ATWLPPR was rapidly degraded, and the major part of the hydrolysis of the peptide bond(s)

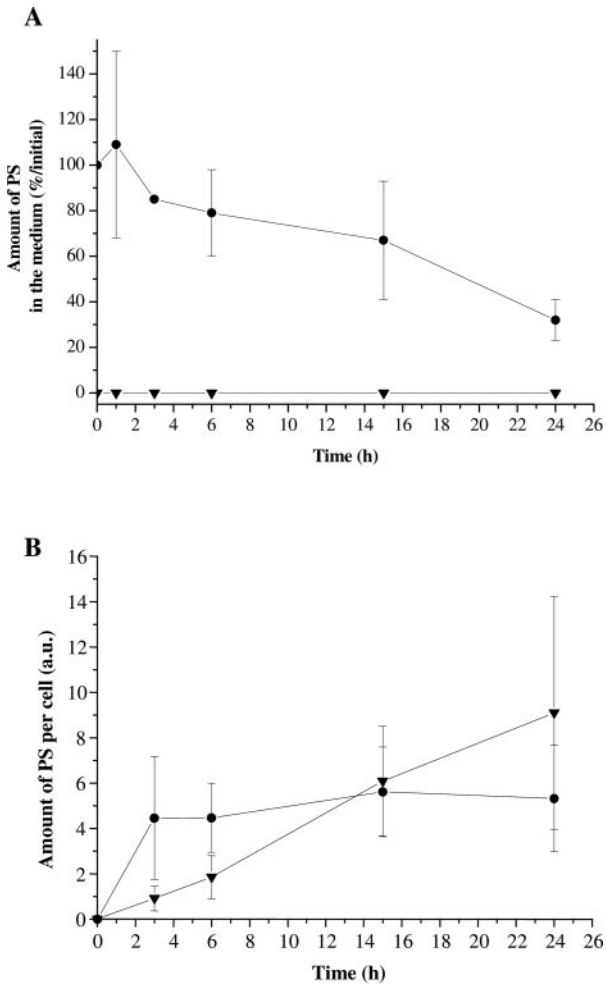


FIG. 6. In vitro stability of TPC-Ahx-ATWLPPR in EGM2 cell medium and inside HUVEC after its incorporation. Amount of TPC-Ahx-ATWLPPR (circle) and TPC-Ahx-A (triangle), expressed as a function of time in EGM2 medium (A) and inside cells, after extraction (B), at different times ranging from 1 to 24 h (data points show the mean ± S.D., $n = 3$).

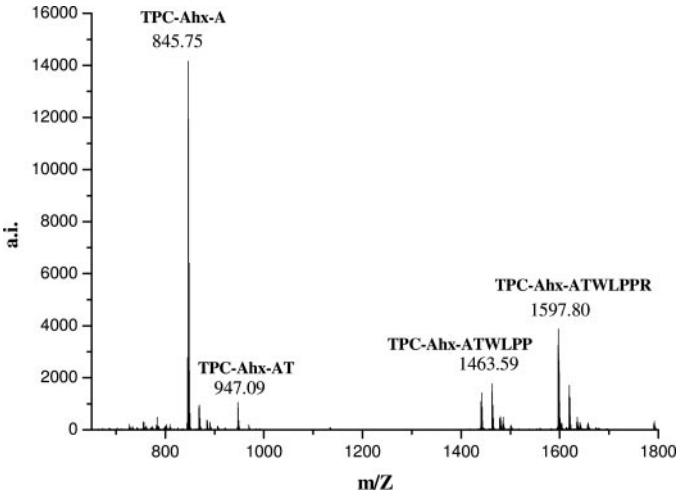


FIG. 7. MALDI-TOF mass spectrum of the PS incorporated by HUVEC following incubation with 1 μM TPC-Ahx-ATWLPPR during 24 h after extraction.

occurred in the liver (Fig. 5A). Indeed, the degradation product represented more than 85% of the total amount of PS present in the liver as early as 2 h p.i. TPC-Ahx-A was characterized as the main metabolic product from liver by MALDI-TOF analysis (Fig. 5B). On the contrary, the percentages of degradation measured at 2 and 4 h p.i. in the tumor were inferior to 25 and 45%, respectively (Fig. 5A). Likewise, the extent and rate of degradation in the skin were very low, with no degradation observed up to 4 h p.i. (Fig. 5A). Therefore, the degradation observed in vivo in the plasma likely resulted from a release from some organs (i.e., liver, spleen) where the degradation took place.

In Vitro Stability in Cell Medium and Endothelial Cells. TPC-Ahx-ATWLPPR was stable in EGM2 medium up to 24 h at 37°C (Fig. 6A). No degradation product could be observed in the cell medium, and the supernatant was progressively depleted in TPC-Ahx-ATWLPPR because of its high rate of uptake in HUVEC (Fig. 6A). On the contrary, TPC-Ahx-ATWLPPR was progressively degraded inside HUVEC into products that were still fluorescent and, therefore, potentially photocytotoxic (Fig. 6B). The amount of degradation increased as a function of incubation time. TPC-Ahx-ATWLPPR was significantly degraded ($p < 0.05$) from 6 h after incorporation by HUVEC. By MALDI-TOF mass spectrometry, a main degradation product (TPC-Ahx-A) and two secondary metabolites (TPC-Ahx-AT and TPC-Ahx-ATWLPP) were identified (Fig. 7).

Localization of TPC-Ahx-ATWLPPR. Intracellular localization in HUVEC following incubation with TPC-Ahx-ATWLPPR (1 μM, 24 h) was studied using fluorescent organelle probes and confocal fluorescence microscopy. Yellow color on merged images from intracellular localization of the PS (red) and the probe (green) indicates colocalization of both (Fig. 8). TPC-Ahx-ATWLPPR mostly localized into lysosomes (Fig. 8A) compared with Golgi apparatus, mitochondria, and endoplasmic reticulum (Fig. 8, B–D, respectively).

In Vitro Stability of TPC-Ahx-ATWLPPR in HUVEC in Presence of an Inhibitor of Lysosomal Enzymes. Ammonium chloride is a lysosomotropic weak base that, as such, inhibits the action of lysosomal enzymes by increasing lysosomal pH. As shown on Fig. 9, the addition of this inhibitor to the cell medium significantly decreased the percentage of intracellular degradation of TPC-Ahx-ATWLPPR, arguing for the role of lysosomal enzymes in the degradation process.

Discussion

It is well known that, following its in vivo administration, a drug is progressively cleared and/or metabolized into active or inactive metabolites. The photocytotoxic activity of the TPC-Ahx-ATWLPPR molecule is brought by the PS moiety, whereas selectivity for the tumor neovasculature is a result of the presence of the peptidic component. Therefore, inactive metabolites would result from the breakdown of the macrocycle, whereas sole degradation of the peptide would be detrimental to selectivity but would still give rise to active molecules. Indeed, one of the main disadvantages of peptides is their sensitivity to proteolysis, which limits their use in vivo (Adessi and Soto, 2002). In this work, we first investigated the in vivo stability of TPC-Ahx-ATWLPPR following i.v. injection into tumor-bearing mice. A significant degradation could be observed in plasma from 4 h p.i. We identified the main metabolic product as being TPC-Ahx-A. This metabolite would very probably have lost any selectivity for angiogenic endothelial cells that line the neovessels of the tumor because the arginyl residue at the C terminus of the ATWLPPR peptide has been shown to be essential for affinity for NRP-1 (Tournaire et al., 2001). Therefore, for future in vivo assessments of photodynamic activity of TPC-Ahx-ATWLPPR, the drug-light interval (DLI, i.e., the time interval between PS injection and its subsequent activation by light) should preferably, according to this study,

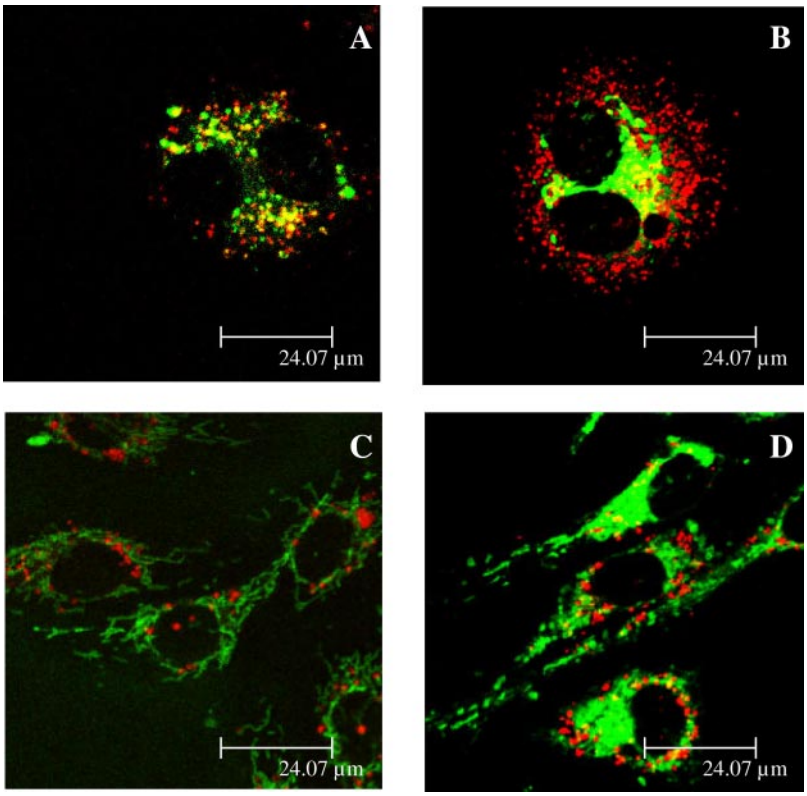


FIG. 8. Confocal fluorescence microscopy images of HUVEC double-stained with TPC-Ahx-ATWLPPR (in red) and an organelle probe (in green). A, LysoTracker Green-stained lysosomes. B, BODIPY FL C_5-ceramide-stained Golgi apparatus. C, MitoTracker Green-probed mitochondria. D, 3,3′-dihexyloxacarbocyanine iodide-stained endoplasmic reticulum.

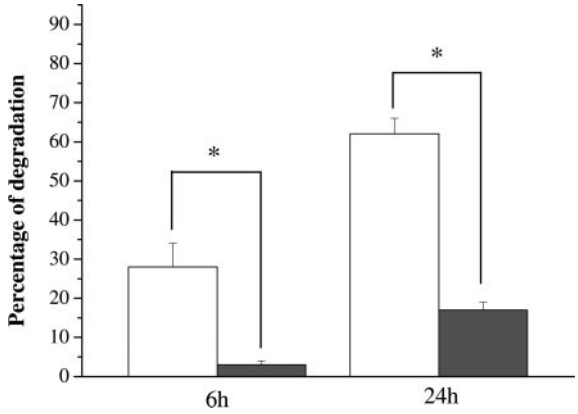


FIG. 9. Percentage of degradation product inside HUVEC following incubation with TPC-Ahx-ATWLPPR (1 μM; 6 or 24 h) with (light gray bars) or without (white bars) lysosomal peptidase inhibitor (ammonium chloride 30 mM) treatment as assessed by reverse-phase HPLC.

be inferior or equal to 4 h. Indeed, after that time, more than 20% of the PS present in plasma is TPC-Ahx-A, which does not possess any specificity for endothelial cells lining the tumor vessels, contrary to TPC-Ahx-ATWLPPR. Using a DLI longer than 4 h would certainly allow PS accumulation in nontargeted tissues (e.g., skin), with potential skin photosensitivity problems, but would probably not improve much its uptake in target tissues (i.e., endothelium of tumor vessels).

The PS (TPC-Ahx-ATWLPPR and TPC-Ahx-A) accumulated at much higher levels in the liver than in the tumor. This has also been observed for other hydrophobic PS, including Foscan (GmbH, Ingelheim, Germany), with tumor to liver ratios of PS concentrations as low as 0.03 (Jones et al., 2003), but only PS present in the tumor will be activated because of localized light irradiation. It should be noted that PS present at the time of irradiation in plasma and endothelial cells lining the tumor vessels, and not only in tumor cells, also play a major part in tumor eradication by PDT by inducing vascular damage and occlusion of tumor vessels, which leads to tumor deprivation in nutrients and oxygen (Cramers, 2003).

A variety of proteases are present in human plasma, including both exopeptidases and endopeptidases (McDonald and Barrette, 1980, 1986). Therefore, we assessed the in vitro stability of TPC-Ahx-ATWLPPR in mouse and human plasma and did not observe any degradation during at least 24 h at 37°C, thus discarding any role of the plasma peptidases in the degradation phenomenon. The conjugated PS accumulated to high levels into organs of the reticuloendothelial system (i.e., liver, spleen), in agreement with its hydrophobic character, like other lipophilic PS (e.g., Foscan) (Jori and Fabris, 1998; Jones et al., 2003). Indeed, on administration into the bloodstream, most PS associate with various serum proteins, including both high- and low-density lipoproteins (LDL) and albumin (Hopkinson et al., 1999). LDL are believed to be important in the transportation of hydrophobic PS. α_2-Macroglobulin/LDL receptors are widely found in cells of various types, with LDL uptake most pronounced in adrenals, liver, and spleen (Rosenkranz et al., 2000).

The conjugated PS was rapidly degraded in organs of the reticuloendothelial system, as soon as 1 h p.i. Some degradation also occurred quite rapidly in the tumor, less than in metabolic organs but more than in plasma. All these results strongly suggested that the degradation product TPC-Ahx-A identified in plasma resulted from the degradation of the peptide in organs of the reticuloendothelial system, mainly liver, and subsequent release into the bloodstream.

To gain mechanistic insight into the degradation phenomenon, we undertook in vitro studies in HUVEC. TPC-Ahx-ATWLPPR was not degraded into the cell culture medium, thus allowing it to accumulate at high levels into cells through active targeting of NRP-1, as confirmed by the high depletion rate of the PS observed in the medium. On the contrary, following internalization by HUVEC, the peptide moiety of TPC-Ahx-ATWLPPR was progressively degraded, mostly

into TPC-Ahx-A, as observed in vivo, but also to a lesser extent into TPC-Ahx-AT and TPC-Ahx-ATWLPP. Degradation of the peptidic moiety inside cells is not detrimental to our strategy because the peptide has already played its targeting role, and that, at this stage, only the PS moiety is involved in the photocytotoxic effect.

The distribution of a PS within cells depends on the route by which it enters, as well as on its physicochemical properties, e.g., its hydrophobicity/hydrophilicity; the type, number, and arrangement of its charged groups; the presence of a central atom in the tetrapyrrole structure; its aggregation state, etc. (Rosenkranz et al., 2000). For example, LDL-bound PS can enter target cells via receptor-mediated endocytosis. Chlorin e6 covalently bound to LDL has been detected in enzymatically active lysosomes (Schmidt et al., 1992). We showed that TPC-Ahx-ATWLPPR also mostly localized into lysosomes, in agreement with the fact that TPC-Ahx-ATWLPPR targets NRP-1 and should be incorporated into cells by a receptor-mediated endocytosis mechanism. Lysosomes are known to contain a large variety of hydrolytic enzymes, which degrade proteins and other substances taken up by endocytosis. The main proteolytic activities experienced by endocytosed peptides and proteins in the endosomal/lysosomal pathway belong to a family of papain-like proteases called cathepsins (Roberts, 2005). The pH rate profiles indicate that the low pH of the lysosomes (approximately 5.5) is optimal for the majority of cathepsins. Treatment with the lysosomotropic weak base ammonium chloride significantly decreased the extent of intracellular degradation.

Because some peptides can be significantly stabilized by glycosylation or the addition of D-amino acids at the N terminus (Powell et al., 1993), the relatively slow rate of degradation observed in plasma may be, at least in part, caused by the steric protection afforded by the PS moiety at the N terminus, which may prevent the peptide from being degraded by aminopeptidases. Moreover, no oxidation into a porphyrin, which would present less interesting photophysical properties than the corresponding chlorin, could be observed on the PS moiety in any experiment, as assessed by MALDI-TOF analysis, contrary to what has been observed with other PS (Laville et al., 2004).

To achieve higher selective delivery to the tumor neovessels, the in vivo stability of the peptide moiety of the conjugate may be increased through formulation and/or chemical modification. The first strategy encompasses the use of pegylated liposomes, which will impact on the pharmacokinetics of the PS and which may limit its accumulation in the reticuloendothelial system. For example, Ichikawa et al. (2005) encapsulated benzoporphyrin derivative monoacid ring A in pegylated liposomes modified with the H-Ala-Pro-Arg-Pro-Gly-OH pentapeptide, which had earlier been isolated as a peptide specific to angiogenic endothelial cells. Pegylation of liposomes aims to avoid opsonization in the bloodstream, which is a prerequisite for the clearance of the liposomes by the reticuloendothelial system, such as liver and spleen (Ichikawa et al., 2005). The second method implies the generation of modified peptides with improved stability properties, through (e.g., cyclization) the use of D-amino acids and reduced peptide bonds, etc. (Adessi and Soto, 2002), for which the knowledge of the site of degradation on the peptides that were determined in this study is essential.

The ATWLPPR peptide has already been used in several in vitro and in vivo studies (Janssen et al., 2003; Rodrigues et al., 2003; Perret et al., 2004; Renno et al., 2004), but, to the best of our knowledge, none has reported on its instability. The present study draws attention to this potential problem with peptides, especially in the case of targeting strategies, and provides useful information for the choice of the DLI for in vivo assessments of photodynamic activity and for the future design of more stable molecules.

References

Adessi C and Soto C (2002) Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability. *Curr Med Chem* **9:**963–978.

Barberi-Heyob M, Vedrine PO, Merlin JL, Millon R, Abecassis J, Poupon MF, and Guillemin F (2004) Wild-type p53 gene transfer into mutated p53 HT29 cells improves sensitivity to photodynamic therapy via induction of apoptosis. *Int J Oncol* **24:**951–958.

Cramers P, Ruevekamp M, Oppelaar H, Dalesio O, Baas P, and Stewart FA (2003) Foscam uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy. *Br J Cancer* **88:**283–290.

Di Stasio B, Frochot C, Dumas D, Even P, Zwier J, Muller A, Didelon J, Guillemin F, Viriot ML, and Barberi-Heyob M (2005) The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin. *Eur J Med Chem* **40:**1111–1122.

Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, and Peng Q (1998) Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* **90:**889–905.

Folkman J (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* **1:**27–31.

Hopkinson HJ, Vernon DI, and Brown SB (1999) Identification and partial characterization of an unusual distribution of the photosensitizer meta-tetrahydroxyphenyl chlorin (temoporfin) in human plasma. *Photochem Photobiol* **69:**482–488.

Ichikawa K, Hikita T, Maeda N, Yonezawa S, Takeuchi Y, Asai T, Namba Y, and Oku N (2005) Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels. *Biochim Biophys Acta* **1669:**69–74.

Janssen AP, Schiffelers RM, ten Hagen TL, Koning GA, Schraa AJ, Kok RJ, Storm G, and Molema G (2003) Peptide-targeted PEG-liposomes in anti-angiogenic therapy. *Int J Pharm* **254:**55–58.

Jones HJ, Vernon DI, and Brown SB (2003) Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan) in vivo: correlation with pharmacokinetics. *Br J Cancer* **89:**398–404.

Jori G and Fabris C (1998) Relative contributions of apoptosis and random necrosis in tumour response to photodynamic therapy: effect of the chemical structure of Zn(II)-phthalocyanines. *J Photochem Photobiol B* **43:**181–185.

Laville I, Pigaglio S, Blais JC, Loock B, Maillard P, Grierson DS, and Blais J (2004) A study of the stability of tri(glucosyloxyphenyl)chlorin, a sensitizer for photodynamic therapy, in human colon tumoural cells: a liquid chromatography and MALDI-TOF mass spectrometry analysis. *Bioorg Med Chem* **12:**3673–3682.

McDonald JK and Barrette AJ (1980) *Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography. 1. Endopeptidases*, Academic Press, London.

McDonald JK and Barrette AJ (1986) *Mammalian Proteases: A Glossary and Bibliography. 2. Exopeptidases*, Academic Press, London.

Perret GY, Starzec A, Hauet N, Vergote J, Le Pecheur M, Vassy R, Leger G, Verbeke KA, Bormans G, Nicolas P, et al. (2004) In vitro evaluation and biodistribution of a 99mTc-labeled anti-VEGF peptide targeting neuropilin-1. *Nucl Med Biol* **31:**575–581.

Powell MF, Stewart T, Otvos L Jr, Urge L, Gaeta FC, Sette A, Arrhenius T, Thomson D, Soda K, and Colon SM (1993) Peptide stability in drug development. II. Effect of single amino acid substitution and glycosylation on peptide reactivity in human serum. *Pharm Res (NY)* **10:** 1268–1273.

Renno RZ, Terada Y, Haddadin MJ, Michaud NA, Gragoudas ES, and Miller JW (2004) Selective photodynamic therapy by targeted verteporfin delivery to experimental choroidal neovascularization mediated by a homing peptide to vascular endothelial growth factor receptor-2. *Arch Ophthalmol* **122:**1002–1011.

Roberts R (2005) Lysosomal cysteine proteases: structure, function and inhibition of cathepsins. *Drug News Perspect* **18:**605–614.

Rodrigues S, Van Aken E, Van Bocxlaer S, Attoub S, Nguyen QD, Bruyneel E, Westley BR, May FE, Thim L, Mareel M, et al. (2003) Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling. *FASEB J* **17:**7–16.

Rosenkranz AA, Jans DA, and Sobolev AS (2000) Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. *Immunol Cell Biol* **78:**452–464.

Schmidt U, Birngruber R, and Hasan T (1992) [Selective occlusion of ocular neovascularization by photodynamic therapy]. *Ophthalmologe* **89:**391–394.

Schneider R, Tirand L, Frochot C, Vanderesse R, Thomas N, Gravier J, Guillemin F, and Barberi-Heyob M (2006) Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy. *Anticancer Agents Med Chem* **6:**469–488.

Sharman WM, van Lier JE, and Allen CM (2004) Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* **56:**53–76.

Tirand L, Frochot C, Vanderesse R, Thomas N, Trinquet E, Pinel S, Viriot ML, Guillemin F, and Barberi-Heyob M (2006) A peptide competing with VEGF(165) binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Controlled Release* **111:**153–164.

Tournaire R, Demangel C, Derbin C, Perret G, Mazie J-C, Plouet J, and Vassy R (2001) Peptides blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis polynucleotides encoding said peptides and methods of use thereof. International Patent Application Publication No. WO-01/72829.

Address correspondence to: Muriel Barberi-Heyob, Laboratoire de Recherche, Centre Alexis Vautrin, Avenue de Bourgogne, F-54511 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France. E-mail: m.barberi@nancy.fnclcc.fr

Pharmacocinétique et biodistribution du peptide conjugué et de son produit de dégradation

Chapitre IV : Pharmacocinétique et biodistribution du peptide conjugué et de son produit de dégradation

I. Résumé

Ce travail avait pour but d'évaluer la pharmacocinétique et la biodistribution tissulaire *in vivo* de la TPC-Ahx-ATWLPPR afin de compléter les résultats de l'étude préliminaire de stabilité. Pour faciliter son accès aux cellules endothéliales, la TPC-Ahx-ATWLPPR a été administrée par voie i.v. Les paramètres pharmacocinétiques ont été obtenus grâce à une **analyse non compartimentale**. L'élimination du conjugué est relativement rapide à partir du compartiment sanguin avec une **constante d'élimination de 0,062 h^{-1} et une demi-vie de 11,0 h**. La concentration en PS s'est révélée essentiellement concentrée dans des **organes du système réticuloendothélial** tels que le foie, la rate et les reins. Dans ces derniers, les profils d'élimination du PS sont comparables avec des demi-vies courtes de 12,2, 15,1, et 19,7 h, respectivement. Le PS s'accumule rapidement et à des **niveaux élevés dans la tumeur**, avec **2,3% de la dose injectée par gramme de tissu 1 h après injection**. La partie peptidique est dégradée à des taux différents selon l'organe étudié. La majorité du processus de dégradation s'est produit dans les organes du système réticuloendothélial. Un produit métabolique résultant du clivage enzymatique de la liaison peptidique entre l'alanine et la thréonine a été détecté dans le plasma dès 2 h après l'injection. En tenant compte de l'absorption aspécifique des produits de dégradation, la concentration totale en composés photoactivable dans la tumeur pourrait présenter une activité photodynamique intéressante. Au contraire, les concentrations restent **faibles dans la peau.** Cette étude fournit des informations essentielles quant au choix de l'intervalle de temps à ne pas dépasser pour activer le PS.

II. "Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice"

Thomas N., Tirand L., Chatelut E., Plenat F., Frochot C., Dodeller M., Guillemin F., Barberi-Heyob M.
Photochem Photobiol Sci, 2008, 7(4):433-41.

Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice

Noémie Thomas,[a,f] Loraine Tirand,[a,f] Etienne Chatelut,[b] François Plénat,[c] Céline Frochot,[d,f] Marc Dodeller,[e,f] François Guillemin[a,f] and Muriel Barberi-Heyob*[a,f]

Received 27th November 2007, Accepted 29th January 2008
First published as an Advance Article on the web 14th February 2008

Destruction of the neovasculature is essential for efficient tumor eradication by photodynamic therapy (PDT). The PDT anti-vascular effect can be promoted by developing addressed photosensitizers localized preferentially to the tumor vascular compartment. A new photosensitizer conjugated to an heptapeptide [H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH (ATWLPPR)] targeting neuropilin-1, a Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) co-receptor, has been synthesized. It was administered intravenously for an easier access to endothelial cells lining the vasculature in human malignant glioma-bearing nude mice. Plasma pharmacokinetic parameters were derived from plasma concentration–time data using a non-compartmental analysis and validated a relatively rapid elimination from the blood compartment with an elimination rate constant of 0.062 h^{-1} and a biological half-life of 11.0 h. The photosensitizer was mainly concentrated in organs such as liver, spleen and kidneys, which are rich in reticuloendothelial cells. In these organs, the elimination profiles of the photosensitizer were comparable, with half-lives as short as 12.2, 15.1 and 19.7 h, respectively. The peptidic moiety of the conjugated photosensitizer was degraded to various rates depending on the organ considered, most of the degradation process occurred in organs of the reticuloendothelial system. A metabolic product resulting from the enzymatic cleavage of the peptide bond between Ala and Thr was detected in plasma at all the examined time points from 2 h post-injection. The conjugated photosensitizer accumulated rapidly and at high levels in the tumor, with 2.3% of injected dose per gram of tumor tissue at 1 h after injection. Taking into account the aspecific uptake of the degradation product, the tumor levels of total photoactivable compounds might exhibit an interesting photodynamic activity. On the contrary, levels of total photoactivable compounds remained low in the skin. This study provides essential information for the choice of the time interval not to exceed to activate the photosensitizer.

1 Introduction

Photodynamic therapy (PDT) involves the combination of photosensitizers with light as a treatment, and has been an established medical practice for about twenty years. Current primary applications of PDT are age-related macular degeneration (AMD) and several types of cancers and precancers. In anti-cancer PDT, tumor destruction results from direct photo-oxidation reactions induced in tumor cells, or from indirect effects, involving both initiation of an immune response against tumor cells and destruction of the neovasculature. Tumor vasculature and parenchyma cells are both potential targets of PDT damage. Destruction of the neovasculature of tumors may indirectly lead to tumor eradication and this anti-vascular effect induced by PDT is thought to play a major contribution in the destruction of some vascularized tumors.[1] This PDT anti-vascular effect can be potentiated by developing addressed photosensitizers localized preferentially in the tumor vascular compartment. A limited number of studies have been performed to actively target tumor endothelial markers (*e.g.* $\alpha_v\beta_3$ integrin, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) receptor-2 (VEGFR-2)).[1–5] Intracellular targeting is a challenge due to the difficulty to achieve sufficient penetration into the target cell. VEGF exists as different spliced forms, the most important being $VEGF_{165}$. Its two main receptors, VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (Flk-1/KDR) are located almost exclusively on endothelial cells. More recently, neuropilin-1 (NRP-1) was also found to function as a splice form specific receptor for the $VEGF_{165}$ isoform. It was found that, when co-expressed in cells with KDR,

[a]*Centre de Recherche en Automatique de Nancy, Nancy-University, CNRS, Centre Alexis Vautrin, Brabois, Avenue de Bourgogne, F-54511, Vandoeuvre-lès-Nancy Cedex, France. E-mail: m.barberi@nancy.fnclcc.fr; Tel: +33 3 83 59 83 06*
[b]*Institut Claudius Regaud, 20–24 rue du Pont Saint-Pierre, F-31052, Toulouse, France*
[c]*Laboratoire d'Histopathologie Expérimentale et Moléculaire, Faculté de Médecine, 9 Avenue de la Forêt de Haye BP 184, Nancy-University, F-54505, Vandoeuvre-lès-Nancy, France*
[d]*DCPR, Département de Chimie Physique de Réactions, Nancy-University, CNRS, 1 rue Grandville, BP20451, F-54001, Nancy, France*
[e]*LSMCL, Laboratoire de Spectrométrie de Masse et de Chimie Laser, Paul Verlaine-Metz University, 1 Bvd Arago, F-57078, Metz, France*
[f]*, GDR 3049 "Médicaments Photoactivables - Photochimiothérapie (PHOTOMED)"*

NRP-1 enhanced the binding of $VEGF_{165}$ to KDR and $VEGF_{165}$-mediated chemotaxis.[6] Since angiogenic endothelial cells of the tumor vasculature represent an interesting target to potentiate the anti-vascular effect of PDT, we have recently described the conjugation of a photosensitizer (5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin, TPC), *via* a spacer (6-aminohexanoic acid, Ahx), to a VEGF receptor specific-heptapeptide (H-Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg-OH, noted ATWLPPR), and demonstrated that TPC-Ahx-ATWLPPR binds to NRP-1.[7] We previously examined the *in vitro* stability of this conjugate. TPC-Ahx-ATWLPPR was degraded after incorporation into human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and remained stable *in vitro* in plasma. Following intravenous injection in glioma-bearing nude mice, TPC-Ahx-ATWLPPR was degraded and TPC-Ahx-A was identified as the main metabolic product.[8]

In the current study, we propose to complete these preliminary results by determining the *in vivo* pharmacokinetics and tissue distribution of TPC-Ahx-ATWLPPR in human malignant glioma-bearing nude mice in order to assess the involvement of the different compartments in the degradation process and the ability of total photoactivable compounds to distribute in slowly and rapidly perfused tissues. In practice, we obtained useful information for the choice of the best time interval for the activation of the photosensitizer.

2 Materials and methods

2.1 Chemical characterization

5-(4-Carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin (TPC) was purchased from Frontier Scientific (Logan, Utah). We conjugated TPC *via* a spacer (6-aminohexanoic acid, Ahx), to a heptapeptide (ATWLPPR). The photosensitizer–peptide conjugate TPC-Ahx-ATWLPPR was synthesized on a multichannel peptide synthesizer, according to a classical Fmoc/tBu solid phase methodology and purified by reverse phase high-performance liquid chromatography (HPLC), as described previously.[7] Purity and chemical identity of TPC-Ahx-ATWLPPR were assessed by HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry analysis.

2.2 Animals and tumor model

Female athymic Foxn1 nude mice (*nu/nu*) were obtained from Harlan (Gannat, France), and used at an age of 7–9 weeks and a weight of 20–25 g. Animal procedures were performed according to institutional and national guidelines. The model of human malignant glioma was obtained using U87 cells, as described previously.[9] The tumor was maintained *in vivo* by sequential passages in nude mice. For the experiments, source tumors were excised, cleaned from necrotic tissue, cut into small chunks, and transplanted subcutaneously in either of the hind legs of each mouse.

2.3 Pharmacokinetics and biodistribution

When tumors reached a volume of 70 ± 30 mm^3 (15 ± 5 days after tumor grafting), TPC-Ahx-ATWLPPR (2.8 mg kg^{-1}) dissolved in polyethylene glycol (PEG) 400–ethanol–water (30/20/50, v/v/v) was injected *via* the tail vein of the mice, and which were subsequently kept in the dark. After a time ranging from 1 to 48 h, mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (Ketalar®, Panpharma, Fougères, France) at 60 mg kg^{-1} and xylazine (Rompun®, Bayer Pharma, Puteaux, France) at 8 mg kg^{-1}. Blood samples were collected in heparinized tubes by cardiac puncture, and centrifuged at 1 500 *g* for 10 min at 4 °C. Mice were sacrificed by cervical dislocation and the tumor and organs (kidneys, skin, liver, brain and spleen) were carefully excised, rinsed with saline and blotted dry. At least three animals were used per time point. All samples were protected from light. Plasma, tumor and organs samples were weighted and kept at −80°C in polypropylene tubes, until analysis by HPLC and/or MALDI-TOF mass spectrometry.

2.4 Preparation of samples for HPLC and MALDI-TOF mass spectrometry analyses

Extraction of the photosensitizer from plasma, tumor, organs was carried out as described previously.[7,10] To remove surface blood, tissue samples (tumor, organs) were rinsed in physiological saline, blotted dry and weighted. They were then crushed in 500 µL TEM buffer (10 mM Tris, 1.66 mM EDTA, 5 mM molybdate, pH 7.4) using an Ultra-Turrax® T25 device (IKA, Labortechnik, Janke & Kunkel, Germany). All samples were spiked with 5,10,15,20-tetrakis(*m*-hydroxyphenyl)porphyrin (*m*-THPP) as an internal standard of extraction. Then, for all types of samples, extraction involved solvent precipitation using methanol combined with dimethyl sulfoxide (5 : 0.1, v/v). Samples were then vortexed, homogenized for 30 min, and sonicated for 10 min (Branson 1200, Roucaire Instruments Scientifiques, Les Ulis, France). Tissue and cellular debris were removed by centrifugation (3 500 *g*; 15 min). The photosensitizer-containing organic phase was then extracted and concentrated by evaporation at room temperature for 3 h with a Speedvac® apparatus (Fisher Bioblock Scientific, Illkirch, France) and re-suspended into 200 µL methanol.

2.5 HPLC analysis

Chromatographic analyses were performed by reverse phase HPLC on a C18 column (250 × 4.6 mm internal diameter, YMC, Interchim, Montluçon, France), under isocratic elution conditions with a mobile phase composed of methanol–H_2O (95 : 5, v/v). A fluorescence emission detection was used, with excitation and emission wavelengths of 416 nm and 652 nm, respectively, corresponding to the maximal intensities of the absorption and fluorescence emission spectra of TPC-Ahx-ATWLPPR, respectively.[7] All chemicals were of analytical grade quality. Because the addition of the peptide did not change significantly the photophysical properties of the photosensitizer,[7] the percentages of degradation were estimated from the data of areas under the curve. The chromatographic data were processed using GOLD™ Nouveau software version 1.6 (Beckman Coulter France A. A., Roissy CDG, France). For each animal, the mean tissue concentration was calculated. The pharmacokinetic data were analyzed by a non-compartmental mathematical method (Kinetica Version 4.1).

2.6 MALDI-TOF mass spectrometry analyses

One µL of a 2,5-dihydroxybenzoic acid solution (150 mg mL^{-1} in water–acetonitrile, 1 : 1, v/v) was mixed with 1 µL of sample and spotted on the stainless steel MALDI targets. The solvent

was evaporated prior to insertion in the source. Mass spectra were acquired over the range 0–2000 Da. Analyses were performed on a Bruker Reflex IV time-of-flight (TOF) mass spectrometer (Bruker-Daltonic, Bremen, Germany) equipped with the SCOUT 384 probe ion source. The system used a pulsed nitrogen laser (337 nm, model VSL-337ND, Laser Science Inc., Boston, MA) with a maximal energy of 400 μJ pulse^{-1}. The detector signals were amplified and transferred to the XACQ program on a SUN work station (Sun Microsystems Inc. Palo Alto, CA). Spectra were processed with the XMass 5.1 program (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). External calibration of MALDI mass spectra was carried out using sodic and potassic distribution of PEG 600 and PEG 1500 mixtures.

2.7 Fluorescence imaging of photosensitizer and blood vessels (CD31/PECAM-1 staining)

The intratumoral distribution of TPC-Ahx-ATWLPPR was investigated by using the photosensitizer fluorescence, and colocalization with angiogenic endothelial cells. Four hours after injection of 2.8 mg kg^{-1} of TPC-Ahx-ATWLPPR, a tumor biopsy sample was excised from the animal under reduced light conditions (to minimize potential photobleaching of the photosensitizer). The tumor was coated with Tissue-Tek® OCT (Sakura Firetek, Torrance, CA, USA) and then placed first in liquid nitrogen-cooled isopentane for at least 40 s, to completely freeze the biopsy, and, afterwards, placed at −80°C. The sample was mounted on the cryotome and sections that were approximately 5–7 μm thick were cut. The distribution of the photosensitizer was determined by imaging the sample immediately using a fluorescence microscope [excitation filter microscope (Provis AX-70 Olympus, Rungis, France) with an excitation filter (band pass 440–480 nm), a dichroic mirror (570 nm), and an emission filter (high pass 590 nm)].[11]

Immediately after the TPC-Ahx-ATWLPPR tumor tissue localization, the immunohistochemical analysis of endothelial cells distribution was undertaken on the same sections. The sections were fixed 2–3 min in a buffer [Tris-HCl 0.1 M pH 7.4, 3.2 mM calcium acetate, 22.8 mM zinc acetate, 36.7 mM zinc chloride]. The slides were air-dried, followed by washing in isotonic PBS–Tween (Phosphate Buffered Saline pH 7.4, 0.1% Tween 20). The sections were incubated for 2–3 h at room temperature with the primary antibody [1 : 20 dilution of rat anti-mouse CD31 (Pharmingen/BD Biosciences, Le-Pont-de-Claix, France) in PBS pH 7.4 with 0.1% (m/v) sodium azide, 0.06% (m/v) *N*-ethylmaleimide, 1% (m/v) BSA, 30% (v/v) glycerol]. After washing the slides with PBS–Tween, the sections were incubated for 1 h with the secondary antibody (1 : 400 dilution in PBS—Tween of mouse preadsorbed, biotinylated rabbit anti-rat IgG, Clinisciences, Montrouge, France), followed by three washes with PBS–Tween. The sections were then incubated 1 h at room temperature with a fluorescent streptavidin complex (1:4000 dilution in PBS–Tween of Streptavidin-Alexa Fluor 488, Invitrogen/Molecular Probes, Cergy-Pontoise, France). The slides were then placed back on the microscope stage and the stage set at the previous co-ordinates and the same field of tissue previously imaged for photosensitizer distribution was brought into view. The distribution of CD31 in the sections was then visualized by fluorescence on the same microscope (excitation band-pass filter 460–490 nm, dichroic mirror 505 nm and emission band-pass filter 510–550 nm). Images for all sections were taken under the same microscope gain settings.

2.8 Statistical analysis

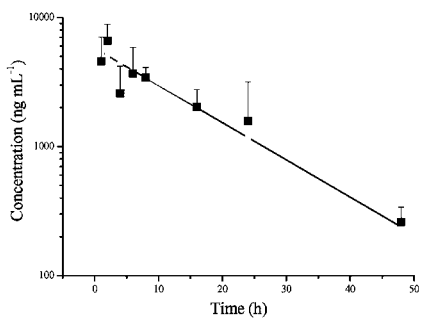
Unless otherwise indicated, all data are mean values ± standard deviations (s.d.) calculated from at least three independent experiments.

3 Results and discussion

3.1 Plasma pharmacokinetics of TPC-Ahx-ATWLPPR in human malignant glioma-bearing nude mice

A U87 human malignant glioma model xenografted in nude mice was selected for this *in vivo* study. Indeed, we have selected previously evidenced a significant tumor vascularization in this tumor model, by studying tumor vascular density.[9] The pharmacokinetic distribution of TPC-Ahx-ATWLPPR in the plasma at 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16.0, 24.0 and 48.0 h post-intravenous injection was determined by a relatively simple and sensitive HPLC method with fluorescence detection. Fig. 1A shows the levels of TPC-Ahx-ATWLPPR in mice plasma, represented by a semi-logarithmic plot of mean TPC-Ahx-ATWLPPR concentration in plasma *versus* time after intravenous injection. TPC-Ahx-ATWLPPR was administered intravenously (2.8 mg kg^{-1}), for an easier access to endothelial cells lining the vasculature. The plasma levels appear to decline exponentially as would normally be expected following an intravenous injection. According to the kinetic profile, the clearance of TPC-Ahx-ATWLPPR from plasma follows a simple

A



B

Pharmacokinetic parameters	Value
Elimination rate constant (h^{-1})	0.062
Half-life (h)	11.0
Volume of distribution (mL kg^{-1})	520
Clearance time (g h^{-1} kg^{-1})	31.1
Mean residence time (h)	16.7

Fig. 1 Blood pharmacokinetic analyses. (A) Pharmacokinetic profile of TPC-Ahx-ATWLPPR in the plasma of U87 tumor-bearing mice after intravenous injection with 2.8 mg kg^{-1} (data points show the mean ± s.d., $n = 3$ or 4). The curve was approximated by $C(t) = 5761.36\ e^{(-0.062t)}$, with $r = 0.994$. (B) Pharmacokinetic parameters obtained using the log linear method. Data were analyzed by a non-compartmental approach.

monoexponential decay and for that reason, the data were analyzed by a non-compartmental approach (Fig. 1A). From 6 h post-injection to infinity (auto detected best interval), the curve may be approximated by $C(t) = 5761.36\ e^{(-0.062t)}$ with $r = 0.994$, giving a real overall view of the plasma pharmacokinetics. The levels of TPC-Ahx-ATWLPPR in the plasma were measured to be maximal (4.6 and 6.6 μg mL^{-1}) at the earliest time points tested, *i.e.* 1.0 h and 2.0 h post-injection, respectively. Fig. 1B shows the non-compartmental pharmacokinetic parameters obtained in plasma. These data validate a relatively rapid elimination from the blood compartment with *e.g.* an elimination rate constant of 0.062 h^{-1} and a biological half-life of 11.0 h, compared to *m*-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (*m*-THPC, Foscan®, Temoporfin), plasma clearance in mice was biexponential, with biological half-life values of 1.3 and 20.9 h.[12] Using also a non-compartmental analysis, the biological half-life of *m*-THPC in the BDIX rat was 22.6 h[13] and 80 h for a Photofrin® equivalent in the same model.[14] These results show that the clearance of TPC-Ahx-ATWLPPR is faster than that of *m*-THPC and Photofrin®. Comparable pharmacokinetic analyses in patients have determined half-lives of 452 h for Photofrin®[15] and 30 h for *m*-THPC.[16]

The volume of distribution of TPC-Ahx-ATWLPR (520 mL kg^{-1}, Fig. 1B) corresponds to an extra-vascular distribution and suggests that some tissues retain preferentially TPC-Ahx-ATWLPPR (*i.e.* the volume is 10-fold larger than the blood volume of a mouse (70–80 mL kg^{-1})). TPC-Ahx-ATWLPPR may be retained in the vascular system, due to protein binding as observed previously for chlorin-type photosensitizers.[13,17] This is consistent with plasma binding studies showing an unusual protein-binding pattern for the hydrophobic photosensitizers.[18] The value of the octanol/PBS distribution coefficient log D_{pH} 7.4 was equal to 2.6, arguing also for the hydrophobic character of TPC-Ahx-ATWLPPR.[8]

3.2 Tissue distribution and pharmacokinetics of TPC-Ahx-ATWLPPR

In order to explore the biodistribution of TPC-Ahx-ATWLPPR in healthy tissues, the concentration of the photosensitizer was determined in organs (brain, skin, muscle, liver, kidney and spleen) from at least three mice at eight different times. Following intravenous injection, all the studied tissues show an accumulation of TPC-Ahx-ATWLPPR in the highly perfused tissues such as liver, spleen and kidney, which accumulate higher levels of TPC-Ahx-ATWLPPR than the peripheral tissues like skin and muscle (Fig. 2). Once TPC-Ahx-ATWLPPR has penetrated in skin and brain, it does not enter an elimination phase, as the log linear portion of the log concentration *versus* time plot remains almost constant from 16 to 48 h, excepted in the muscle (Fig. 2A). The systemic expositions of TPC-Ahx-ATWLPPR in the liver and the spleen were 4.5- and 5.5-fold higher, respectively, than in the skin. In the kidney, the spleen and the liver, TPC-Ahx-ATWLPPR exhibited a similar elimination profile, but with a shorter half-life, as with *m*-THPC in the same organs (Fig. 2B). We validated a rapid disappearing of TPC-Ahx-ATWLPPR from these metabolic organs compared to *m*-THPC with, *e.g.* in liver, a half-life of 12.2 h for TPC-Ahx-ATWLPPR *versus* 97.3 h for *m*-THPC in rats.[13] A slow elimination of *m*-THPC from liver and lung in nude mice was also described by Cramers *et al*. with half-life values of 19.7 ± 4 h and 18.2 ± 43.5 h, respectively and drug levels in all other tissues remaining fairly constant from 3 to 72 h.[12]

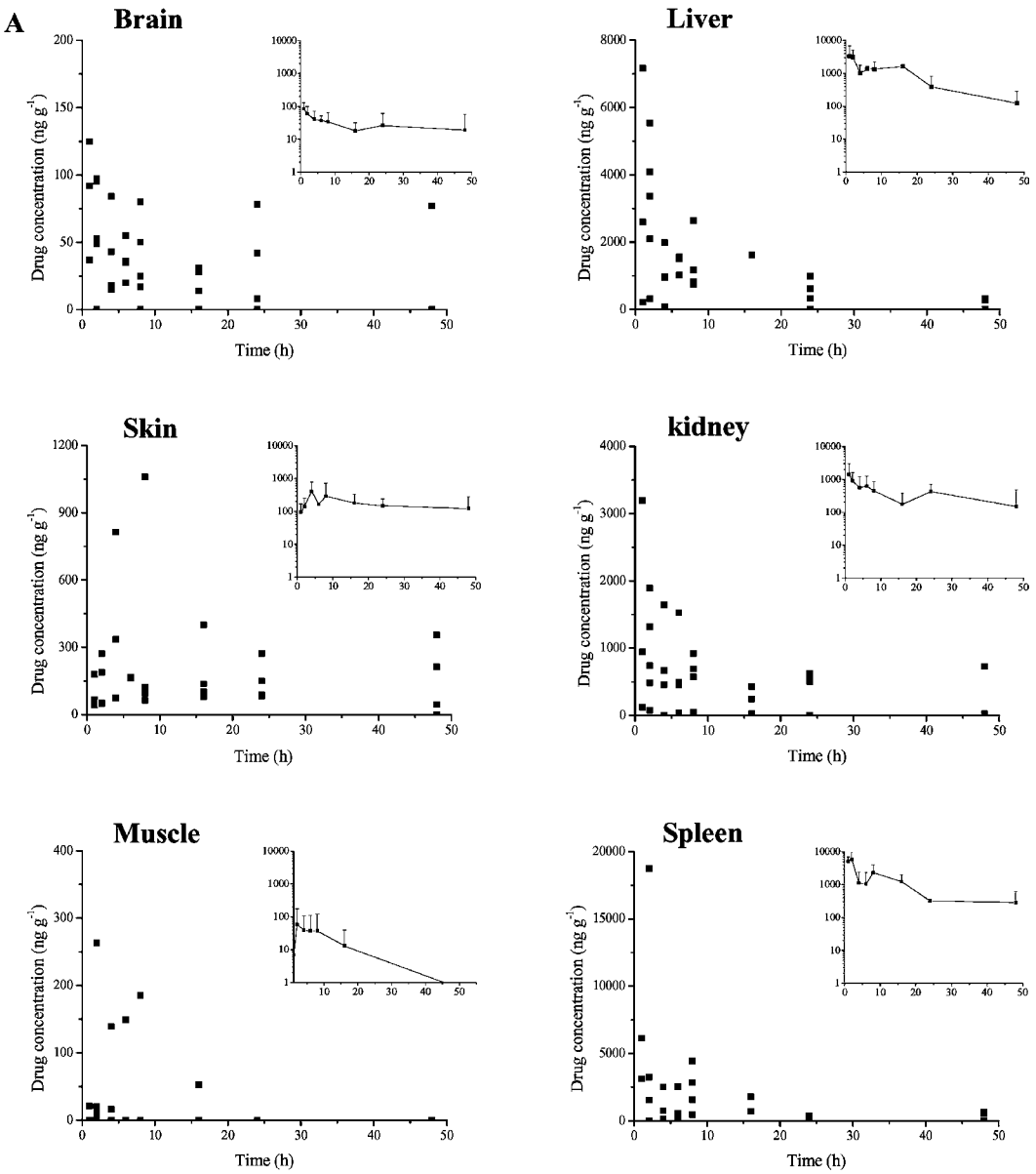
TPC-Ahx-ATWLPPR accumulates to high levels into organs of the reticuloendothelial system, corresponding also to rapidly perfused tissues (*i.e.* liver, spleen). This is in agreement with its hydrophobic character,[19] like other lipophilic photosensitizers, *e.g.* Foscan®.[13] Indeed, upon administration into the bloodstream, most photosensitizers associate with various serum proteins including both high and low density lipoproteins (LDLs) and albumin.[18] LDLs are believed to be important in the transportation of hydrophobic photosensitizers. Alpha 2-Macroglobulin/LDL receptors are widely found in cells of various types, with LDL uptake being most pronounced in adrenals, liver and spleen.[20]

TPC-Ahx-ATWLPPR levels are also measured in the brain. As previously reported, various brain regions express NRP-1 receptors, suggesting that TPC-Ahx-ATWLPPR could also target brain tissue itself, as well as tumor endothelial cells.[21]

3.3 Stability of TPC-Ahx-ATWLPPR in tumor-bearing nude mice

The molecular structure of the conjugate TPC-Ahx-ATWLPPR is shown on Fig. 3A. No degradation product of TPC-Ahx-ATWLPPR could be observed in plasma up to 1 h after intravenous injection (data not shown). From 2 h post-injection, peaks with shorter retention times (12 ± 2 min) than those corresponding to TPC-Ahx-ATWLPPR (21 ± 3 min) appeared on the HPLC chromatograms of plasma and increased as a function of time after injection (Fig. 3B). Several peaks can be observed on the chromatograms. The peak eluted at 5 ± 1 min corresponds to *m*-THPP, used as an internal standard (as described in Material and methods 2.4). The double peak with a retention time of about 21 min arises from the presence of two isomers of the molecule, due to the reduction of a double bond on either opposing side of the tetrapyrrolic macrocycle (Fig. 3A). These isomers could also be observed in the commercial TPC used for synthesis. Identity was confirmed by MALDI-TOF mass spectrometry (theoretical mass = 1596.81 Da, experimental mass = 1596.77 Da, Fig. 3C). We identified a predominant metabolic product as resulting from the enzymatic cleavage of the peptide bond between the alanyl and threonyl residues. Hence, TPC-Ahx-A was characterized by MALDI-TOF analysis (Fig. 3C). This degradation product was detected in plasma at all time points from 2 h post-injection, as well as in other organs (Fig. 4) whereas TPC-Ahx-ATWLPPR was demonstrated to remain stable *in vitro* in human and mice plasma up to 24 h at 37 °C.[8] A variety of proteases are present in human plasma, including both exo- and endopeptidases.[22,23] Thus, the stability of TPC-Ahx-ATWLPPR *in vitro* in plasma discards any role of the plasma peptidases in the degradation phenomenon.

The amount of TPC-Ahx-A in plasma was inferior to 25% up to 4 h post-injection (less than 20% of the total amount of photosensitizers), whereas it represented more than 85% of the total amount of photosensitizer present in the liver as early as 2 h post-injection. On the contrary, no degradation was observed in the skin up to 4 h post-injection. In the organs of the reticuloendothelial system, TPC-Ahx-ATWLPPR was rapidly degraded, and the major part of the hydrolysis of the peptide bond between the Ala and Thr residues occurred in the liver



B

Pharmacokinetics parameters	Brain	Skin	Liver	kidney	Spleen
$AUC_{0\text{-last}}$ (µg g^{-1} h) *	1.3	8.5	38.3	16.0	46.9
Half-time (h)	34.8	53.1	12.2	19.7	15.1
Mean residence time (h)	50.7	78.5	17.1	30.3	19.5

* Area under the concentration calculated from time zero to infinity.

Fig. 2 (A) TPC-Ahx-ATWLPPR concentrations in healthy tissues (brain, skin, muscle, liver, kidney and spleen) in nude mice after intravenous injection with 2.8 mg kg^{-1}. TPC-Ahx-ATWLPPR concentrations for each organ are represented in ng g^{-1} tissue for each animal. The insert curves show the mean with semi-logarithmic representation (± s.d., $n \geq 3$). (B) Pharmacokinetic parameters of TPC-Ahx-ATWLPPR in brain, skin and organs of the reticuloendothelial system (liver, kidney and spleen).

(Fig. 4). Some degradation also occurred quite rapidly in the tumor, less than in metabolic organs but more than in plasma. The percentages of degradation measured at 2 h and 4 h post-injection in the tumor were inferior to 25 and 45%, respectively (Fig. 4). Therefore, for future *in vivo* assessments of photodynamic activity of TPC-Ahx-ATWLPPR, the drug-light interval (*i.e.*, the time interval between photosensitizer injection and its subsequent activation by light) should preferably, according to this results, be inferior to 4 h. After that time, more than 20% of the photo-activable compounds present in the vasculature is TPC-Ahx-A,

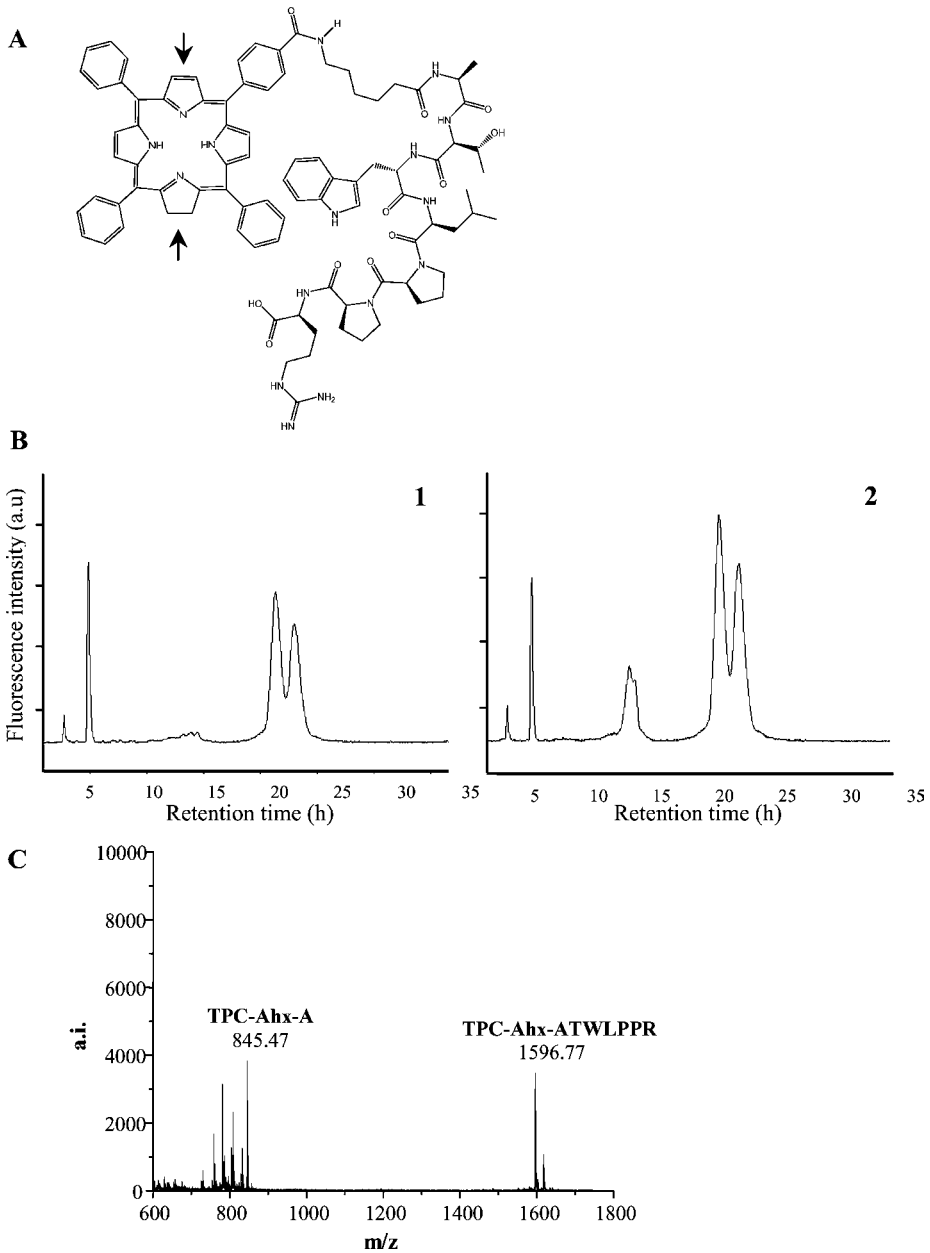


Fig. 3 (A) Molecular structure of one of the isomers of the peptide-chlorin conjugate TPC-Ahx-ATWLPPR. Arrows indicate the two possible sites of double bond reduction during synthesis of a chlorin from a porphyrin, leading to a mixture of two isomers. (B) Representative HPLC chromatograms of plasma extracts 2 h (1) and 4 h (2) after intravenous administration of 2.8 mg kg^{-1} of TPC-Ahx-ATWLPPR to tumor-bearing nude mice, supplemented with *m*THPP (retention time, 5 ± 1 min) as an internal standard. Peaks eluted at shorter times (12 ± 2 min) than TPC-Ahx-ATWLPPR (21 ± 3 min) appear on the chromatograms; their intensity increases as a function of the time after administration. For chromatographic conditions and extraction procedure, see Materials and methods. (C) MALDI-TOF mass spectrum of plasma extracts 4 h post-injection.

which does not possess any affinity for endothelial cells lining the tumor vessels, in contrast to TPC-Ahx-ATWLPPR. All these results strongly suggested that the degradation product TPC-Ahx-A identified in plasma resulted from the degradation of the peptide in organs of the reticuloendothelial system, mainly liver, and subsequent release into the bloodstream.

TPC-Ahx-ATWLPPR accumulated rapidly in the tumor at relevant levels, which could reach 2.3% of injected dose per gram of tumor tissue, 1 h after intravenous injection. This value is about 4.9-fold higher than Foscan® for the same time after injection.[12,13] TPC-Ahx-ATWLPPR concentrations appeared to decline steadily between 6 and 48 h post-injection (Fig. 5A). The disappearance of TPC-Ahx-ATWLPPR from the tumor is correlated with the appearance of TPC-Ahx-A at the same time. This metabolite would probably have lost any selectivity for angiogenic endothelial cells that line the neovessels of the tumor because the arginyl residue at the C terminus of ATWLPPR peptide has been shown to be essential for affinity for NRP-1.[24] Therefore, as only the photosensitizer moiety is involved in the photocytotoxic effect, if we take into account

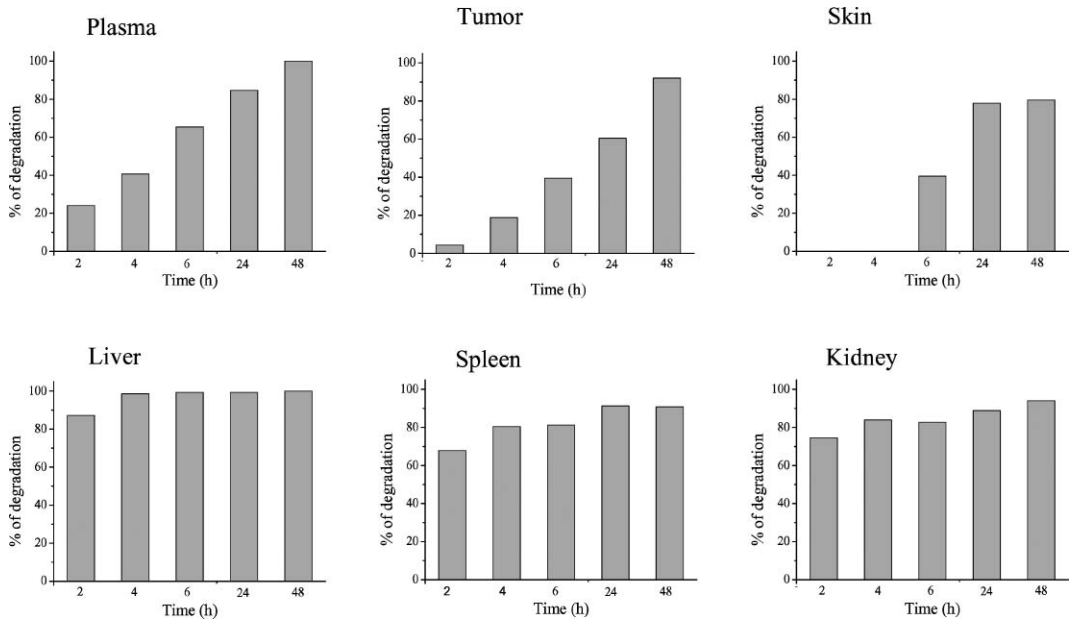


Fig. 4 Percentage of TPC-Ahx-ATWLPPR degradation in plasma, tumor, skin, liver, spleen and kidney expressed as a function of time after an intravenous injection with 2.8 mg kg^{-1}.

TPC-Ahx-ATWLPPR degradation, the tumor levels of total photoactivable compounds (TPC-Ahx-ATWLPPR and TPC-Ahx-A) might exhibit an interesting photodynamic activity. On the contrary, levels of total photoactivable compounds remain low in the skin (Fig. 5B). This result provides also useful information for the choice of the time interval between photosensitizer administration and, light irradiation (drug-light interval, DLI) not to be exceeded for *in vivo* assessments of photodynamic activity. The first question to be addressed, when a new photosensitizer has to be evaluated *in vivo*, is the determination of the optimal PDT conditions. An appropriate dose (often assumed to be related to generated singlet oxygen ($^1O_2$) dose, because most photosensitizer are believed to elicit their damage primarily through $^1O_2$-mediated pathways[25] must be selected, that is sufficient for tumor destruction but low enough not to be toxic. This determination is readily calculated by multiplying the concentration of photosensitizer in the tumor tissue by its extinction coefficient and the light fluence incident in that location.[26] In practice, the factors mainly considered are: photosensitizer dose that is administered, DLI, light fluence and light fluence rate.[13] Tissue distribution and pharmacokinetic data are usually used to determine an appropriate DLI. For this study, a DLI around 4 h could be selected, corresponding to relevant photosensitizer levels in tumor, low photosensitizer levels in skin (which could hinder light penetration in tumor tissue) and low degradation of the peptidic moiety.

3.4 Distribution in tumor tissue

To gain an insight into the tumor tissue localization of the photosensitizer, we undertook an immunohistochemical analysis

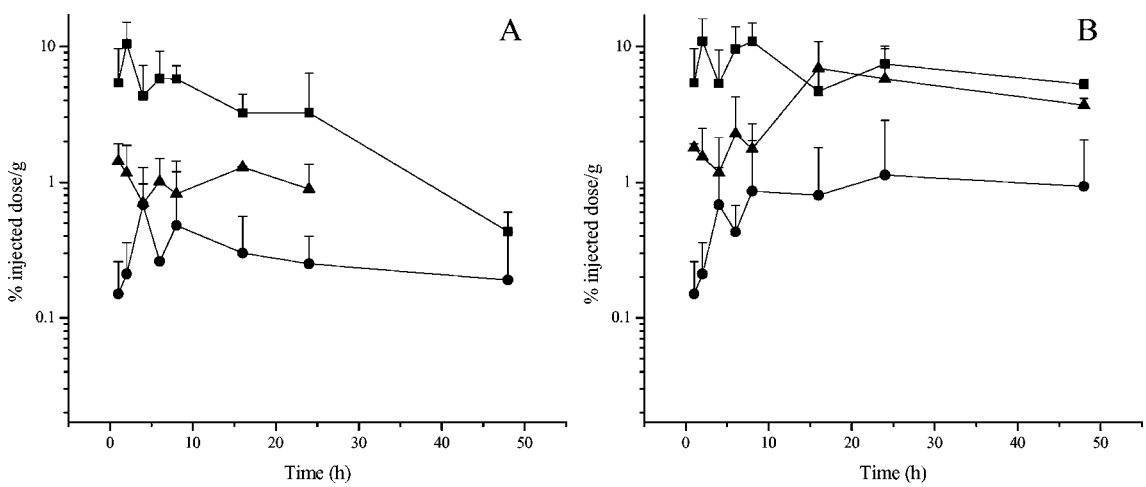


Fig. 5 *In vivo* plasma [square], tumor [triangle] and skin [circle] stability of TPC-Ahx-ATWLPPR in tumor-bearing nude mice. Concentrations, determined by HPLC, of TPC-Ahx-ATWLPPR (A) and total amount of photosensitizer (B) are expressed as a percentage of the injected dose per g tissue, expressed as a function of time after an intravenous injection with 2.8 mg kg^{-1} (data points show the mean ± s.d., $n \geq 3$).

of CD31-staining in human malignant glioma-bearing nude mice. Four hours post-injection, TPC-Ahx-ATWLPPR was colocalized with endothelial cells that were immunohistochemically stained for CD31 (Fig. 6). These results strongly suggest that intratumoral distribution of TPC-Ahx-ATWLPPR is much more important for therapeutic efficacy than the total accumulation of the photosensitizer in the tumor. Therefore, as the endothelial cells lining the vasculature are the intended targets, these tumor data also support an irradiation time in the first hours post-intravenous injection of TPC-Ahx-ATWLPPR in order to take advantage of maximal intravascular concentrations of the photosensitizer.

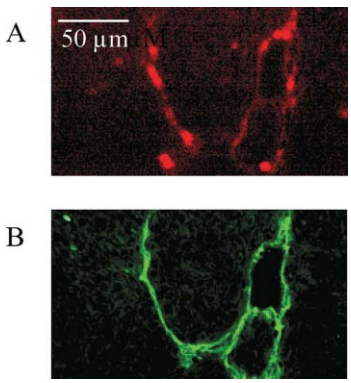


Fig. 6 Localization of the photosensitizer 4 h after the intravenous injection. (A) Color composite image of TPC-Ahx-ATWLPPR fluorescence [red]. (B) Color composite image of CD31-staining [green] in the same region as (A). Analysis of the tumor sections 4 h after TPC-Ahx-ATWLPPR administration showed that the photosensitizer was mainly colocalized inside the vascular endothelium.

PDT-induced anti-vascular effects occur rapidly, are tumor vessel selective, and offer potential advantages over various angiogenesis inhibitors or chemotherapy.[11] According to its intra-tumoral colocalization with endothelial cells 4 h post-injection, TPC-Ahx-ATWLPPR-mediated PDT may produce selective vascular effects, including as in many instance, vasoconstriction, vascular shutdown, thrombus formation, and *in fine*, tumor growth delay (experiments in progress). Moreover, further studies providing mechanistic insights into the antitumor vascular effects of TPC-Ahx-ATWLPPR-mediated PDT, using for example, intravital microscopy and tumor blood flow, will lead us to an optimized DLI value.

3.5 Synthesis scheme of the metabolic profile of the peptide-conjugated chlorine-type photosensitizer

The biological half-life of TPC-Ahx-ATWLPPR in nude mice xenografted with human malignant glioma cells is 11.0 h but the disappearance of TPC-Ahx-ATWLPPR from the blood compartment is also correlated with the appearance of TPC-Ahx-A in the plasma. Hence, the metabolic profile of the photosensitizer and the degradation of its peptidic moiety lead to a tissue distribution which is time post-administration related (Fig. 7). Thus, up to 1 h post-injection, as no degradation of the photosensitizer could be observed in plasma, TPC-Ahx-ATWLPPR firstly accumulated in rapidly perfused tissues like endothelial cells lining the tumor vasculature (2.3% of injected dose per gram of tumor tissue) and, to the highest levels, in organs involved in biotransformation. Secondarily, the skin and muscle accumulated TPC-Ahx-ATWLPPR more slowly in an aspecific manner, maybe through passive diffusion or endocytosis of aggregated photosensitizer molecules (Fig. 7A).

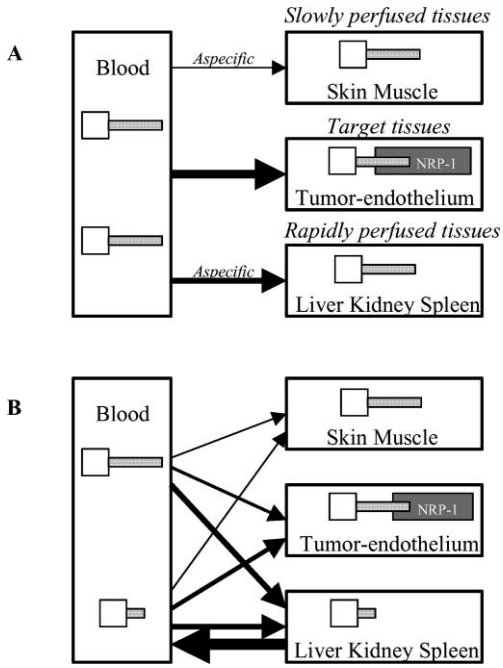


Fig. 7 Illustration of the *in vivo* biodistribution of TPC-Ahx-ATWLPPR [] in relation with its metabolic profile and the appearance of TPC-Ahx-A [], (A) 1 h after intravenous injection (2.8 mg kg^{-1}) into tumor-bearing mice, (B) 6 h post-injection for the same dose.

Two hours post-injection, the degradation product was already observed in organs of the reticuloendothelial system. After 6 h, we observed the presence of TPC-Ahx-A in the plasma, likely resulting from a release from some organs where the degradation took place. After that, the photoactivable compound distributed in an aspecific manner in the tumor but also in the skin (Fig. 7B). Hence, we suggest that TPC-Ahx-A could have different mechanisms of sequestration or distribution and removal from the liver, possibly conferring a disadvantage. One hypothesis is that TPC-Ahx-A could redistribute to lipoproteins in the liver before further distribution to other tissues.

4 Conclusion

This study validates a relatively rapid elimination from the blood compartment of a peptide-conjugated chlorine-type photosensitizer in tumor bearing nude mice and provides essential information for the choice of the better time interval not to exceed for the activation of the photosensitizer (drug-light interval) and to perform photodynamic efficiency *in vivo.*

Abbreviations

Ahx, 6-aminohexanoic acid; AMD, Age-related Macular Degeneration; a.i., arbitrary intensity; a.u., arbitrary units; BSA, bovine serum albumin; DLI, drug-light interval; EDTA, ethylene diamine tetra acetic acid; Fmoc, 9-fluorenyl-methoxy-carbonyl; HPLC, High Performance Liquid Chromatography; HUVEC, Human

Umbilical Vein Endothelial Cells; LDL, Low-density lipoprotein; MALDI-TOF, Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation-Time of Flight; *m*-THPC, *m*-tetra (hydroxyphenyl) chlorin; *m*-THPP, 5,10,15,20-tetrakis (*m*-hydroxyphenyl) porphyrin; NRP-1, neuropilin-1; PBS, phosphate-buffered saline; PDT, photodynamic therapy; PECAM, Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule; PEG, polyethylene glycol; s.d., standard deviation; tBu, tertio-butyl; TEM buffer, Tris EDTA molybdate buffer; TPC, 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenylchlorin; VEGF, Vascular Endothelial Growth Factor.

Acknowledgements

This work was supported by the research funds of the French "Ligue Nationale Contre le Cancer, Comités Lorrains".

References

1 K. Ichikawa, T. Hikita, N. Maeda, S. Yonezawa, Y. Takeuchi, T. Asai, Y. Namba and N. Oku, Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels, *Biochim. Biophys. Acta*, 2005, **1669**, 69–74.

2 V. Chaleix, V. Sol, M. Guilloton, R. Granet and P. Krausz, Efficient synthesis of RGD-containing cyclic peptide-porphyrin conjugates by ring-closing metathesis on solid support, *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**, 5295–5299.

3 V. Chaleix, V. Sol, Y.-M. Huang, M. Guilloton, R. Granet, J.-C. Blais and P. Krausz, RGD-Porphyrin Conjugates: Synthesis and Potential Application in Photodynamic Therapy, *Eur. J. Org. Chem.*, 2003, **8**, 1486–1493.

4 R. Z. Renno, Y. Terada, M. J. Haddadin, N. A. Michaud, E. S. Gragoudas and J. W. Miller, Selective photodynamic therapy by targeted verteporfin delivery to experimental choroidal neovascularization mediated by a homing peptide to vascular endothelial growth factor receptor-2, *Arch. Ophthalmol.*, 2004, **122**, 1002–1011.

5 C. Frochot, B. Di Stasio, R. Vanderesse, M. J. Belgy, M. Dodeller, F. Guillemin, M. L. Viriot and M. Barberi-Heyob, Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity, *Bioorg. Chem.*, 2007, **35**, 205–220.

6 S. Soker, S. Takashima, H. Q. Miao, G. Neufeld and M. Klagsbrun, Neuropilin-1 Is Expressed by Endothelial and Tumor Cells as an Isoform-Specific Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor, *Cell*, 1998, **92**, 735–745.

7 L. Tirand, C. Frochot, R. Vanderesse, N. Thomas, E. Trinquet, S. Pinel, M. L. Viriot, F. Guillemin and M. Barberi-Heyob, A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells, *J. Controlled Release*, 2006, **111**, 153–164.

8 L. Tirand, N. Thomas, M. Dodeller, D. Dumas, C. Frochot, B. Maunit, F. Guillemin and M. Barberi-Heyob, Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: an *in vivo* and *in vitro* study, *Drug Metab. Dispos.*, 2007, **35**, 806–813.

9 S. Pinel, M. Barberi-Heyob, E. Cohen-Jonathan, J. L. Merlin, C. Delmas, F. Plenat and P. Chastagner, Erythropoietin-induced reduction of hypoxia before and during fractionated irradiation contributes to improvement of radioresponse in human glioma xenografts, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2004, **59**, 250–259.

10 M. Barberi-Heyob, H. Rezzoug, J. L. Merlin and F. Guillemin, Sensitive isocratic liquid chromatographic assay for the determination of 5,10,15,20-tetra(*m*-hydroxyphenyl)chlorin in plasma and tissue with electrochemical detection, *J. Chromatogr., B: Biomed. Sci. Appl.*, 1997, **688**, 331–338.

11 D. E. Dolmans, A. Kadambi, J. S. Hill, C. A. Waters, B. C. Robinson, J. P. Walker, D. Fukumura and R. K. Jain, Vascular accumulation of a novel photosensitizer, MV6401, causes selective thrombosis in tumor vessels after photodynamic therapy, *Cancer Res.*, 2002, **62**, 2151–2156.

12 P. Cramers, M. Ruevekamp, H. Oppelaar, O. Dalesio, P. Baas and F. A. Stewart, Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy, *Br. J. Cancer*, 2003, **88**, 283–290.

13 H. J. Jones, D. I. Vernon and S. B. Brown, Photodynamic therapy effect of *m*-THPC (Foscan) *in vivo*: correlation with pharmacokinetics, *Br. J. Cancer*, 2003, **89**, 398–404.

14 D. I. Vernon, J. A. Holroyd, S. M. Stribbling and S. B. Brown, The quantitative determinationof Photofrin and Polyhaematoporphyrin in plasma: pitfalls and inaccuracies, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1995, **27**, 209–217.

15 S. B. Brown, D. I. Vernon, J. A. Holroyd, S. Marcus, R. Trust, W. Hawkins, A. Shah and A. Tonelli, Pharmacokinetics of photofrin in man, in *Phodynamic Therapy and Biomedical Lasers*, ed. P. Spinelli, M. Dal, Fante and R. Marchesini, Elsevier Science, Amsterdam, 1992, pp. 475–479.

16 T. Glanzmann, C. Hadjur, M. Zellweger, P. Grosiean, M. Forrer, J. P. Ballini, P. Monnier, H. van den Bergh, C. K. Lim and G. Wagnieres, Pharmacokinetics of tetra(*m*-hydroxyphenyl)chlorin in human plasma and individualized light dosimetry in photodynamic therapy, *Photochem. Photobiol.*, 1998, **67**, 596–602.

17 B. Clark, and D. A. Smith, *An Introduction to Pharmacokinetics*, Oxford, Blackwell Scientific Publications, 2nd edn, 1986.

18 H. J. Hopkinson, D. I. Vernon and S. B. Brown, Identification and partial characterization of an unusual distribution of the photosensitizer *meta*-tetrahydroxyphenyl chlorin (temoporfin) in human plasma, *Photochem. Photobiol.*, 1999, **69**, 482–488.

19 G. Jori and C. Fabris, Relative contributions of apoptosis and random necrosis in tumour response to photodynamic therapy: effect of the chemical structure of Zn(II)-phthalocyanines, *J. Photochem. Photobiol., B*, 1998, **43**, 181–185.

20 A. A. Rosenkranz, D. A. Jans and A. S. Sobolev, Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency, *Immunol. Cell Biol.*, 2000, **78**, 452–464.

21 H. Ding, X. Wu, L. Roncari, N. Lau, P. Shannon, A. Nagy and A. Guha, Expression and regulation of neuropilin-1 in human astrocytomas, *Int. J. Cancer*, 2000, **88**, 584–592.

22 J. K. McDonald and A. J. Barrette, *Mammalian proteases: A glossary and citliography.1. Endoproteases*, Academic Press, London, 1980.

23 J. K. McDonald and A. J. Barrette, *Mammalian proteases: A glossary and citliography. 2. Exopeptidases*, Academic Press, London, 1986.

24 A. Starzec, P. Ladam, R. Vassy, S. Badache, N. Bouchemal, A. Navaza, C. H. du Penhoat and G. Y. Perret, Structure-function analysis of the antiangiogenic ATWLPPR peptide inhibiting VEGF(165) binding to neuropilin-1 and molecular dynamics simulations of the ATWLPPR/neuropilin-1 complex, *Peptides*, 2007.

25 M. T. Jarvi, M. J. Niedre, M. S. Patterson and B. C. Wilson, Singlet oxygen luminescence dosimetry (SOLD) for photodynamic therapy: current status, challenges and future prospects, *Photochem. Photobiol.*, 2006, **82**, 1198–1210.

26 J. S. Dysart, G. Singh and M. S. Patterson, Calculation of singlet oxygen dose from photosensitizer fluorescence and photobleaching during *m*THPC photodynamic therapy of MLL cells, *Photochem. Photobiol.*, 2005, **81**, 196–205.

Elaboration de peptides modifiés

Chapitre V : Elaboration de peptides modifiés

I. Matériel et Méthodes

I.1 Synthèse peptidique sur phase solide

I.1.1. Généralités

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre I, la synthèse chimique d'un peptide consiste à coupler successivement les différents acides aminés de la séquence. Si le couplage classique est réalisé en phase liquide, il est également possible d'utiliser la synthèse peptidique sur support solide (SPPS), décrite pour la première fois par Merrifield et pour laquelle il a reçu le prix Nobel en 1984 (Merrifield, 1963).

Cette approche consiste à utiliser une résine insoluble, sur laquelle sont greffés successivement les différents acides aminés qui composent le peptide. La synthèse se fait de l'extrémité carboxy (C) vers l'extrémité amino (N) terminale (synthèse récurrente) par opposition à la synthèse protéique ribosomale. Ceci est dû à la possibilité d'épimérisation du carbone alpha lors du couplage en milieu basique. La résine (qui gonfle dans des solvants de type dichlorométhane ou diméthylformamide) est placée dans un réacteur comportant un fritté à sa base permettant des lavages-filtrations. L'acide aminé et les catalyseurs de couplage, en excès, sont additionnés à la résine et les réactions ont lieu à l'interface solide-liquide. A la fin de chaque étape, des lavages et filtrations permettent d'éliminer les réactifs n'ayant pas réagi alors que la résine sur laquelle est greffé le peptide en croissance reste dans le réacteur. Le temps de synthèse en est considérablement réduit comparé à une synthèse chimique en phase liquide d'autant plus que le système peut être automatisé. Il faut cependant noter que les intermédiaires de synthèse n'étant pas purifiés après chaque étape, la purification finale du peptide, après décrochage de la résine, peut parfois s'avérer problématique.

En SPPS, l'addition de chaque acide aminé correspond à un cycle de deux étapes : le couplage d'un acide aminé protégé et l'élimination du **groupe protecteur** en N-terminal. Il existe deux stratégies pour réaliser une synthèse : **Boc/Bzl** (*tertio*-butyloxycarbonyl/benzyl) et **Fmoc/tBu** (N-(9-**f**luorényl-**m**éth**o**xy**c**arbonyl)/tertiobutyl). Celles-ci diffèrent par le choix du groupe protecteur N-terminal (Boc ou Fmoc) et les groupements protecteurs orthogonaux pouvant être utilisés pour protéger les chaînes latérales des acides aminés. Nous avons retenu une stratégie de type **Fmoc/tBu** (Carpino et Han, 1972). Le groupement protecteur Fmoc s'élimine dans des conditions basiques en présence de pipéridine. La déprotection des chaînes

latérales des acides aminés et le clivage du peptide de la résine sont effectués en présence d'acide trifluoroacétique (TFA).

L'**activation** de l'acide aminé en C-terminal permet d'obtenir des rendements de **couplage** supérieurs à 99%. L'activation classique d'un acide aminé consiste à remplacer le proton de la fonction carboxylique par un groupement « bon partant ». Les solutions courantes demeurent l'utilisation d'esters activés ou d'anhydrides symétriques. La réaction doit être rapide et totale, aussi travaille-t-on avec de larges excès molaires d'acides aminés activés (3 à 10). Nous avons retenu une stratégie utilisant les esters activés d'hydroxybenzotriazole (HOBt) formés *in situ*, en utilisant le réactif de Knorr (trifluoroborate de 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tétraméthyluronium, TBTU) (Knorr *et al.*, 1989). La présence de HOBt semble diminuer les réactions secondaires de racémisation. Une amine tertiaire (*e.g.* diisopropyléthylamine, DIEA) est utilisée pour capturer le contre-anion PF_6^-.

Les étapes de la SPPS sont schématisées sur la Figure 29.

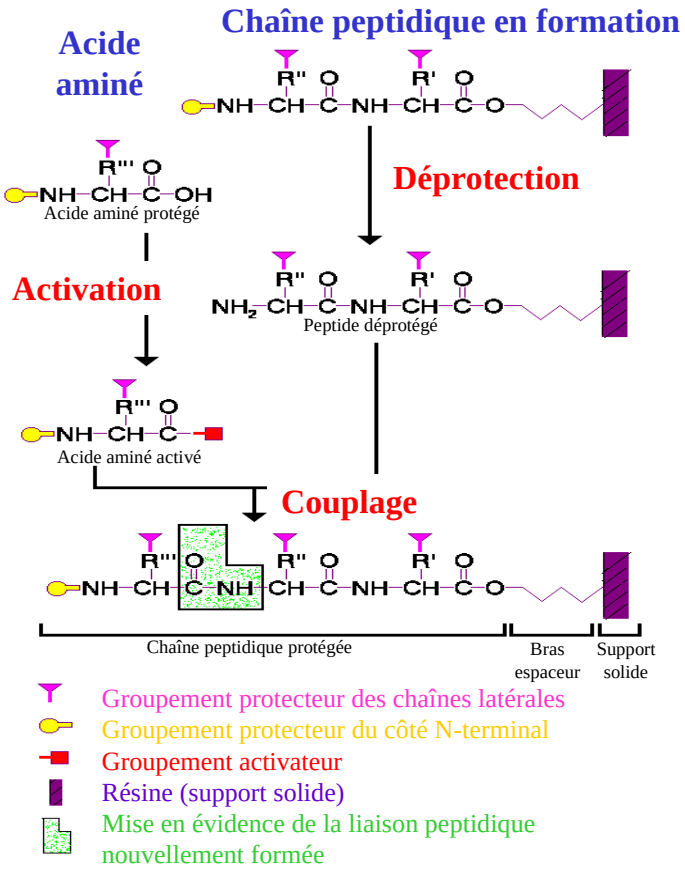


Figure 29 : Schéma des étapes de la synthèse peptidique en phase solide.

La fonction amine du peptide en croissance est d'abord déprotégée, puis l'acide aminé suivant activé en C-terminal est ajouté. La résine est alors lavée pour éliminer l'excès d'acide aminé ne s'étant pas couplé sur la résine. Ces étapes sont répétées pour l'addition de chacun des acides aminés suivants (du C- vers le N-terminal). Lorsque tous les acides aminés ont été couplés, le peptide est déprotégé en N-terminal, puis un traitement acide au TFA enlève les protections latérales du peptide et le libère du support solide. Le peptide est ensuite purifié puis caractérisé.

Les résultats obtenus dans les chapitres III et IV nous ont permis de sélectionner plusieurs stratégies pour élaborer de nouveaux peptides. La dégradation majoritaire a été observée *in vivo* entre les résidus d'acides aminés alanine et thréonine. Une première stratégie simple et peu coûteuse a été de modifier la chiralité en remplaçant le résidu d'acide aminé alanine de la série *L* par son homologue de la série *D* (peptide aTWLPPR). Une autre stratégie plus difficile à mettre en œuvre, d'un point de vue synthèse chimique, mais plus efficace d'après les données de la littérature (voir chapitre I) est de réaliser une liaison pseudopeptidique entre les résidus alanine et thréonine (peptide Aψ[CH_2NH]TWLPPR). Nous avons également synthétisé un peptide *inverso* (simple et peu couteux) et un peptide *rétro-inverso* (simple et efficace mais plus onéreux) : RPPLWTA et rpplwta. L'affinité de ces peptides vis-à-vis des récepteurs au VEGF-A a dans un premier temps été vérifiée. Seuls les peptides présentant une affinité pour NRP-1 ont été couplés au PS.

I.1.2. Synthèse des peptides ATWLPPR et aTWLPPR puis des conjugués TPC-Ahx-ATWLPPR et TPC-Ahx-aTWLPPR

La résine (Fmoc-Arg(Pmc)-Wang résine, Senn Chemicals International, Gentilly, France) est placée dans le réacteur et gonflée à l'aide de dichlorométhane (CH_2Cl_2). Le groupe Fmoc présent en position N-terminale de l'arginine est enlevé en traitant la résine avec de la pipéridine (20% dans de la diméthylformamide, DMF, Sigma). Les acides aminés sont alors successivement greffés, en ajoutant le Fmoc-aminoacide (3 équivalents, Senn Chemicals International), TBTU (3 équivalents, Sigma), HOBt (3 équivalents, Sigma) et DIEA (9 équivalents, Sigma) dans de la DMF, en réalisant des doubles couplages (temps de couplage d'environ 20 min chacun). L'efficacité des couplages est suivie par un test à l'acide trinitrobenzène sulfonique (ATNBS), dans du méthanol. Dans le cas des couplages impliquant une proline, un test au *p*-chloranil, dans l'acétone, est réalisé. Si l'acide aminé est quantitativement greffé au peptide sur la résine, le groupement N-terminal est bloqué par un Fmoc et les billes de résine restent incolores ; dans le cas contraire, elles se colorent en orange avec l'ATNBS, en vert avec le chloranil. Des lavages sont alors effectués pour éliminer les réactifs en excès et le groupement Fmoc de l'acide aminé nouvellement greffé est enlevé avec 20 % de pipéridine. Le protocole ci-dessus est répété pour greffer successivement tous les acides aminés ainsi que le bras espaceur acide aminohexanoïque (Ahx, Senn Chemicals International) pour la synthèse de la TPC-Ahx-ATWLPPR. Les groupements latéraux du

tryptophane et de la thréonine sont respectivement protégés par des groupements Boc et *tertio*-butyl.

L'étape suivante consiste à greffer le PS. Deux équivalents de TPC sont utilisés en simple couplage (afin de limiter la quantité de PS utilisée), mais avec un temps de couplage plus long (environ 16 h). A partir de cette étape, la réaction est réalisée à l'abri de la lumière.

Après lavages, la résine est ensuite séchée sous vide dans un dessiccateur pendant au moins 3 h. La molécule est clivée de son support avec un mélange TFA (82,5 %)/phénol (5 %)/thianisol (5 %)/1,2-éthanedithiol (2,5 %)/eau (5 %). Lors de l'ajout de la solution de clivage à la résine, un refroidissement est réalisé dans du méthanol à 0°C. Une agitation à température ambiante est maintenue pendant 1h30. ATWLPPR ou aTWLPPR est précipité dans l'éther, remis en solution, puis lyophilisé avant purification. La TPC-Ahx-ATWLPPR ou la TPC-Ahx-aTWLPPR est récupérée directement pour les purifications.

I.1.3. Synthèse des peptides *inverso* et *rétro-inverso* (RPPLWTA et rpplwta)

Pour la synthèse du peptide *inverso*, une résine Fmoc-Ala-Wang est utilisée, pour la synthèse du *rétro-inverso*, c'est une résine Fmoc-*D*-Ala-Wang qui est utilisée (Senn Chemicals International). Les résidus d'acides aminés de la série *L* ou *D* sont ensuite couplés de la même façon que précédemment en fonction de la séquence voulue.

I.1.4. Synthèse du pseudopeptide Aψ[CH_2NH]TWLPPR

Le pseudopeptide est également synthétisé, pas à pas, sur phase solide et le lien réduit s'obtient en introduisant le leucinal protégé par un groupement Fmoc sur le peptide en formation suivi d'une réduction de l'imine obtenue.

Le leucinal protégé en N-terminal par un groupement Fmoc (3) est synthétisé à partir de la Fmoc-Ala-OH (1) suivant le protocole de Douat *et al.*, 2002. Dans un premier temps, l'amide de Weinreb (2) est obtenue par action de la morpholine sur l'ester activé créée en présence de chloroformiate d'isobutyle à -15°C (Figure 30). La réduction à froid (0°C) avec du tétrahydroaluminate de lithium ($LiAlH_4$, Aldrich) permet d'obtenir l'aldéhyde correspondant.

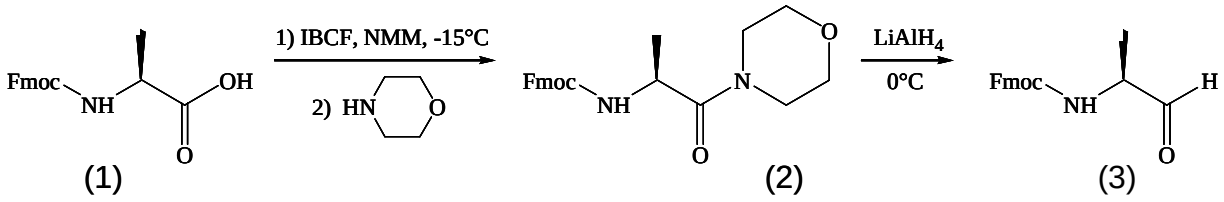


Figure 30 : Synthèse du Fmoc-leucinal (3).

I.1.4.1. Synthèse de « l'amide de Weinreb » (2)

Fmoc-Ala-OH (1) (3,113 g, 10 mmol) est dissous dans du tétrahydrofurane (THF) anhydre (21 mL) et placé sous courant d'azote. La température est abaissée à –15°C et la morpholine NMM (1,1 mL, 10 mmol, NMM, Aldrich) est additionnée, suivie de l'IBCF (isobutylchloroformiate) (1,3 mL, 10 mmol). Un précipité blanc se forme. Après 15 min d'agitation, la suspension est filtrée puis rincée avec du THF anhydre (2 X 10 mL). La NMM (0,88 mL, 10 mmol) est additionnée goutte à goutte au filtrat. Après retour à température ambiante, le solvant est évaporé après 1 h d'agitation. Le résidu est repris dans l'acétate d'éthyle (50 mL) et lavé avec une solution aqueuse d'hydrogénosulfate de potassium 5% (2 X 10 mL, $KHSO_4$, Aldrich), une solution aqueuse d'hydrogénocarbonate de potassium 5% (2 X 10 mL, $KHCO_3$, Aldrich) et enfin, avec de l'eau distillée jusqu'à neutralité. La phase organique est séchée sur du sulfate de magnésium ($MgSO_4$, Aldrich) et concentrée. La mousse obtenue est purifiée par chromatographie sur gel de silice (Acétate d'éthyl/éther de pétrole, 6/4). L'amide de Weinreb se présente sous la forme d'une mousse blanche. Le rendement de la réaction est de 87 %. L'identité de l'amide de Weinreb a été vérifiée par RMN du proton (Figure 31).

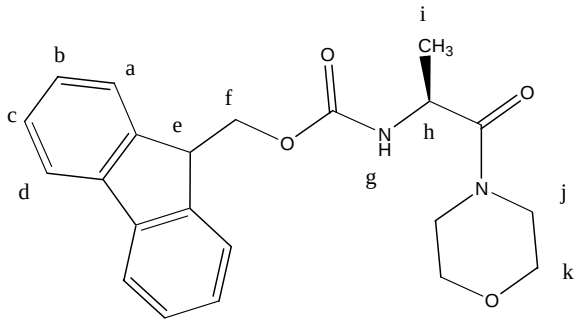


Figure 31 : Structure de l'amide de Weinreb caractérisée par RMN du proton (300 MHz, $CDCl_3$).

RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ = 1,36 ppm (3H, d, J_{i-h} = 6,9 Hz, H_i) ; 3,46-3,49 ppm (4H, m, $H_{j,k}$) ; 4,14 ppm (1H, t, J_{e-f} = 6,6 Hz, H_e) ; 4,24 ppm (1H, m, H_h) ; 4,38 ppm (2H, d, J_{f-e} = 7,1 Hz, H_f) ; 5,86 ppm (1H, d, J_{g-h} = 7,5 Hz, H_g) ; 7,32 ppm (2H, dd, J_{b-a} = J_{b-c} = 7,2 Hz, H_b) ; 7,42 ppm (2H, dd, J_{c-d} = J_{c-b} = 7,3 Hz, H_c) ; 7,60 ppm (2H, d, J_{a-b} = 7,35 Hz, H_a) ; 7,76 ppm (2H, d, 4,J_{d-c} = 7,5 Hz, H_d).

I.1.4.2. Synthèse de Fmoc-Ala-H (3)

L'amide de Weinreb est dissous dans 30 mL de THF anhydre sous courant d'azote. A 0°C, l'agent réducteur, $LiAlH_4$ est additionné par petites portions. La suspension grise formée mousse sous l'effet du dégagement gazeux produit par $LiAlH_4$. Toujours à 0°C, le milieu est hydrolysé au bout de 45 minutes par addition lente d'une solution de $KHSO_4$, 5%. Les deux phases sont séparées et l'aldéhyde est extrait de la phase aqueuse à l'aide d'éther. Les différentes phases organiques sont rassemblées puis séchées et le solvant est évaporé. Le produit est utilisé en l'état, sans étape de purification supplémentaire. Le rendement de la réaction est de 82 % à partir de l'amide de Weinreb, soit 72 % à partir de Fmoc-Ala-OH. L'identité de Fmoc-Ala-H a été vérifiée par RMN du proton (Figure 32).

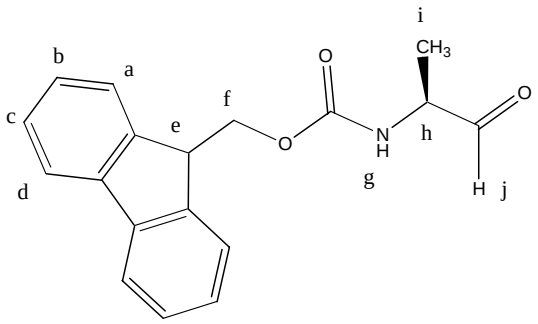


Figure 32 : Structure de Fmoc-Ala-H caractérisée par RMN du proton (300 MHz, $CDCl_3$)

RMN ^1H (300 MHz, $CDCl_3$) : δ = 1,20 ppm (3H, d, J_{i-h} = 6,0 Hz, H_i) ; 4,07 ppm (1H, t, J_{e-f} = 6,7 Hz, H_e) ; 4,26-4,31 ppm (3H, m, $H_{f,h}$) ; 5,58 ppm (1H, brs, H_g) ; 7,16 ppm (2H, dd, $J_{b-a} = J_{b-c}$ = 7,3 Hz, H_b) ; 7,42 ppm (2H, dd, $J_{c-d} = J_{c-b}$ = 7,4 Hz, H_c) ; 7,59 ppm (2H, d, J_{a-b} = 4,15 Hz, H_a) ; 7,62 ppm (2H, d, 4,J_{d-c} = 7,5 Hz, H_d) ; 9,38 ppm (1, s, H_j).

I.1.4.3. Synthèse de liaisons réduites ψ[CH_2-NH] : couplage de Fmoc-Ala-H

L'aldéhyde Fmoc-Ala-H (3 équivalents) est additionné dans le réacteur (contenant TWLPPR-résine), solubilisé dans 5 mL de DMF. Quelques gouttes d'acide acétique (Sigma) glacial sont ajoutées au milieu réactionnel et 3 équivalents de cyanoborohydride de sodium ($NaBH_3CN$, Aldrich) sont additionnés par petites portions sur 1 h. Le mélange est laissé sous agitation pendant une nuit. Le groupement Fmoc est déprotégé dans les conditions précédemment citées.

I.2 Purification des peptides par chromatographie préparative

La purification des composés synthétisés est réalisée par chromatographie liquide haute performance (HPLC) en phase inverse, avec une colonne semi-préparative RP-18 (250 × 10 mm, 5 µm, Apollo Alltech).

Les peptides sont purifiés en utilisant un gradient d'eau-TFA 0,1% ($^{v}/_{v}$) (A) et d'acétonitrile (B) (25 à 100% de B en 30 min) avec un débit de 4 mL/min et une détection à 280 nm avec un détecteur UV-visible SPD-10A (Shimadzu). Les composés sont ensuite lyophilisés et conservés à –20°C.

Les PSs couplés aux peptides ou pseudopeptide sont purifiés sur la même colonne avec un gradient d'eau-TFA 0,1% ($^{v}/_{v}$) (A) et de méthanol (B) (75 à 100% de B en 15 min), avec détection par absorbance à 415 nm (bande de Soret des PSs). Les PSs conjugués sont séchés, lyophilisés et conservés à l'obscurité.

I.3 Caractérisations chimiques

I.3.1. Par résonance magnétique nucléaire

L'identité chimique des peptides synthétisés seuls et conjugués à la TPC a été vérifiée par résonance magnétique nucléaire (RMN) du proton à 300 Hz, dans du diméthyl sulfoxide (DMSO) deutéré.

Le principe de la RMN repose sur l'interaction entre une onde électromagnétique et le moment dipolaire magnétique porté par certains noyaux comme ^{1}H, ^{13}C, ^{15}N, ^{31}P. En présence d'un champ magnétique homogène et stable, les spins de ces noyaux subissent un mouvement de précession dont on peut, après une excitation appropriée du système, détecter la fréquence. Cette fréquence est caractéristique du noyau observé. Les informations classiquement fournies par la RMN sont :

- les déplacements chimiques,
- les constantes de couplage,
- les effets Overhauser nucléaires,
- et les temps de relaxation liés à la largeur et donc à l'intensité des signaux.

Ces informations permettent l'étude des propriétés conformationnelles des peptides, par le biais notamment de la mise en évidence de liaisons hydrogène et de la détermination des angles de torsion pour les petites molécules. L'attribution univoque des signaux et

éventuellement le séquençage ultérieur des peptides sont établis grâce aux techniques particulières de la RMN à deux dimensions. La séquence COSY (COrrelated SpectroscopY) permet de corréler les signaux provenant de noyaux couplés scalairement et dont la valeur de la constante de couplage n'est pas nulle. Elle est utilisée pour identifier ou repérer les systèmes de spins intrarésidus, sans toutefois pouvoir effectuer une attribution univoque lorsque plusieurs résidus identiques sont présents.

Pour l'attribution de tous les protons au sein d'un même résidu, on a recours à une méthode plus sophistiquée, à savoir la séquence TOCSY (TOtally Correlated SpectroscopY).

I.3.2. Par spectrométrie de masse

Les peptides couplés à la TPC ont été analysés par spectrométrie de masse MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization –time of flight*). La technique de MALDI-TOF permet une ionisation douce des composés étudiés, qui sont désorbés par laser depuis une matrice déposée sur une surface métallique. Les molécules sont ionisées puis analysées en fonction de leur rapport masse/charge par un spectromètre à temps de vol (TOF), en utilisant la propriété de déviation d'une particule chargée dans un champ électrique.

Les différents échantillons ont été repris dans 10 µL d'éthanol, la matrice utilisée est l'acide 2,5-dihydroxybenzoïque (DHB, 1M). L'analyse en MALDI-TOF a été réalisée en mode réflectron. La calibration externe de l'appareil est réalisée avec une solution de plusieurs protéines e m/z allant de 700 à 3500.

I.4 Caractéristiques photophysiques

I.4.1. L'absorption en UV-visible

Les spectres d'absorption UV-visible de la TPC et la TPC-Ahx-ATWLPPR dans l'éthanol ont été déterminés par un spectrophotomètre Perkin Elmer Lambda 2. L'absorbance (A), ou densité optique (DO), est définie comme : A= DO= log (I_0/I), où I_0 représente l'intensité incidente et I l'intensité transmise. L'absorbance de la solution de PS étudiée est déterminée à chaque longueur d'onde comprise entre 300 et 800 nm, afin d'obtenir un spectre d'absorption sur cette plage.

Les coefficients d'extinction molaire ε ($mol^{-1}.L.cm^{-1}$), caractéristiques des propriétés d'absorption intrinsèques des PS à une longueur d'onde λ donnée, peuvent alors être déduits,

connaissant la concentration de PS dans la solution (c, en mol.L^{-1}) et la longueur du trajet optique (l, en cm) en utilisant la relation de Beer-Lambert :

$$A = \log (I_0/I) = \varepsilon.l.c$$

I.4.2. La fluorescence

Les spectres de fluorescence ont été obtenus en utilisant un spectrofluorimètre SPEX Fluorolog-3, thermostaté à 25°C, équipé d'une lampe Xénon 450 W et d'un double monochromateur. Afin de ne pas avoir d'effet de peau, l'absorbance des solutions est maintenue inférieure à 0,20 ± 0,02. Nous utilisons une solution aqueuse de fluorescéine à 0,16 mg.L^{-1} comme référence (afin de s'affranchir d'éventuelles variations d'intensité de la source lumineuse), une excitation à 415 nm, une largeur de bande passante de 1,885 nm et un temps d'intégration d'une seconde. Les rendements quantiques de fluorescence Φ_{fluo} de TPC-Ahx-aTWLPPR et TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR sont déterminés dans l'éthanol, en utilisant TPC-Ahx-ATWLPPR (Φ_{fluo}= 0,18 dans l'éthanol) comme référence :

$$\Phi_{fluo} = \Phi_{fluo(ref)} \times \frac{I}{I_{ref}} \times \frac{A_{ref}}{A} \times \left(\frac{n}{n_{ref}}\right)^2$$

Où : A et A_{ref} sont l'absorbance à 415 nm de l'échantillon et de TPC-Ahx-ATWLPPR, respectivement.

I et I_{ref} sont respectivement les aires sous les spectres de fluorescence entre 600 et 750 nm de l'échantillon et de TPC-Ahx-ATWLPPR

n et n_{ref} sont respectivement les indices de réfraction des solvants utilisés pour l'échantillon et TPC-Ahx-ATWLPPR ($n_{ref} = n_{(éthanol)}$ = 1,361 à20°C).

I.4.3. Le rendement quantique en oxygène singulet

Les conjugués étudiés sont excités à l'aide d'une lampe Xénon à arc placée sur un SPEX 1680 possédant un double monochromateur de 0,22 µm. La luminescence de l'$^1O_2$, suite à une excitation à 415 nm, est ensuite mesurée à 1270 nm *via* un monochromateur PTI S/N 1565 grâce à un détecteur à infra-rouge (IR) de la société North Coast Scientific refroidi à l'azote liquide (modèle EO-817L). Les rendements quantiques d'oxygène singulet (Φ_Δ) de la TPC-Ahx-ATWLPPR, la TPC-Ahx-aTWLPPR et la TPC-Ahx-AΨ[CH_2NH]TWLPPR ont été

déterminés dans l'éthanol, en utilisant le rose bengal (Φ_Δ= 0,68 dans l'éthanol, DeRosa et Crutchley, 2002) comme référence.

$$\Phi_\Delta = \Phi^\Delta{}_{(ref)} \times \frac{I}{I_{ref}} \times \frac{A_{ref}}{A}$$

Où : A et A_{ref} correspondent respectivement à l'absorbance à 415 nm de l'échantillon et de la référence (rose de bengal)

I et I_{ref} représentent respectivement l'intensité du pic de luminescence à 1270 nm de l'échantillon et de la référence

L'absorbance des composés étudiés est maintenue inférieure à 0,20 ± 0,02 pour toutes les longueurs d'onde.

I.5 Evaluation de l'affinité moléculaire des peptides par tests de *binding* en ELISA par compétition

Pour évaluer l'affinité des peptides, un test de compétition avec le VEG_{165} biotinylé est utilisé. La surface de microplaques 96 puits Maxisorp (Dutscher) est mise en contact avec les récepteurs (protéines recombinantes, R&D Systems, Lille, France) NRP-1, NRP-2 et Flt-1 dans du PBS (*phosphate buffered saline*), une nuit à température ambiante (*coating*). Après rinçage des puits avec un tampon PBS contenant 0,05% de Tween 20 (tampon de lavage), les plaques sont bloquées avec un tampon de blocage contenant du PBS et 0,5% d'albumine de sérum bovin durant 1 h à 37°C afin d'éviter les intéractions non spécifiques. Le VEGF biotinylé (R&D Systems) est mis au contact des protéines chimériques recombinantes dans les puits en présence ou non de peptide avec du tampon de blocage contenant 2 $\mu g.mL^{-1}$ d'héparine. Pour les PSs couplés aux peptides ou pseudopeptide, 0,5% de Tween 20 sont ajoutés afin de faciliter leur solubilisation. Le $VEGF_{165}$ (R&D Systems) non marqué est utilisé comme témoin positif de déplacement du VEGF biotinylé. Après 2 h d'incubation à 37°C, les puits sont rincés avec le tampon de lavage. La streptavidine couplée à la peroxydase (R&D Systems) est ensuite ajoutée aux puits pendant 30 min à température ambiante. Des rinçages sont ensuite réalisés avant d'ajouter le réactif de coloration (R&D Systems). Après 20 min de contact, la réaction est stoppée par l'addition d'une « solution Stop » fournie par le kit (R&D Systems). La densité optique à 450 nm est ensuite déterminée avec un lecteur de microplaque Titertek Multiscan® MCC/340 (Labsystem, Cergy-Pontoise, France).

Les valeurs de DO d'absorption pour les puits contenant le tampon de blocage seul ont été soustraites. Les résultats ont été exprimés en absorbance relative par rapport aux puits ne contenant que du $VEGF_{165}$ biotinylé. Trois puits par condition ont été utilisés.

Les concentrations en récepteurs, $VEGF_{165}$ biotinylé et $VEGF_{165}$ non marqué sont précisés dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Concentration en récepteurs et ligands utilisés pour le test ELISA.

	Récepteurs (*coating*) ($\mu g.mL^{-1}$)	VEGF Biotinylé ($ng.mL^{-1}$)	VEGF compétiteur ($\mu g.mL^{-1}$)
NRP-1	2	5	0,5
NRP-2	5	10	1
Flt-1	2	5	0,5

I.6 Création d'une lignée cellulaire NRP-1 négative par ARN interférence

I.6.1. Généralités sur les siARN

Cette technique d'ARN interférence (ARNi) est basée sur l'inactivation spécifique d'un ARNm par l'utilisation d'un petit ARN antisens (siARN, *small interference* ARN) pouvant s'apparier à l'ARNm correspondant. L'appariement entre les 2 molécules crée une région d'ARN double brins qui active le système de défense naturel de la cellule contre les virus (les virus présentent très fréquemment des ARN double brins). L'activation du système provoque l'inactivation de l'ARNm ciblé par le siARN en inhibant sa traduction ou en provoquant sa dégradation. Les siARNs peuvent être transfectés dans les cellules eucaroytes adhérentes en culture par les moyens classiques de transfection des ADN plasmidiques. Dans notre stratégie, les deux brins sens et antisens du siARN sont synthétisés à partir du même promoteur sous la forme d'une structure en forme d'épingle à cheveux. Cette boucle (*loop*) sera détruite par l'enzyme Dicer pour activer les siARN *in vitro*. Le complexe RISC (RNA *induced silencing complex*) reconnaît les siARN formés *in vitro* à partir du vecteur et initie le processus d'ARN interférence (Figure 33) (Brummelkamp *et al.*, 2002 ; Cullen, 2006).

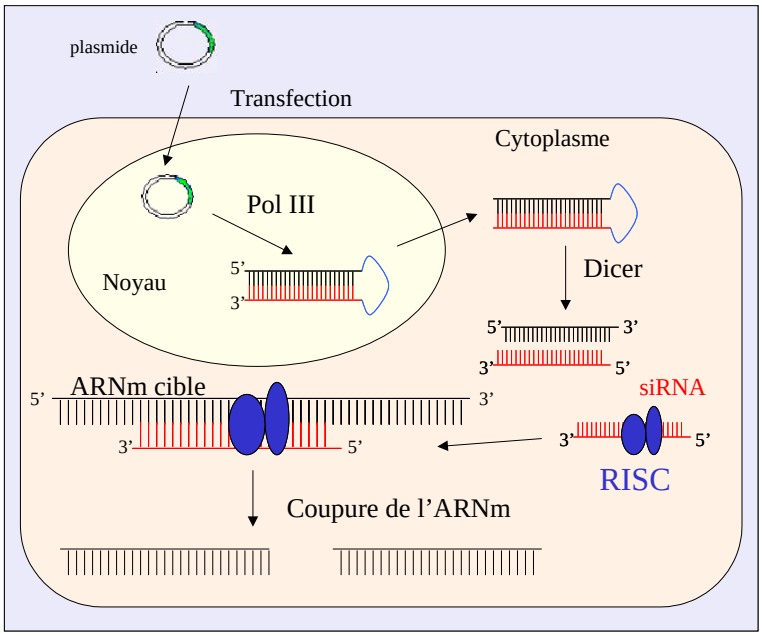


Figure 33 : Représentation schématique simplifiée de la technique d'ARN interférence.

I.6.2. Préparation et amplification du plasmide NRP-1 siARN

I.6.2.1. Préparation du plasmide

Le **plasmide pSIREN** (BD Biosciences Clontech) est linéarisé grâce au site de restriction *Bam*H1/*Eco*R1. Ce plasmide (Figure 34) possède

- un site d'initiation de la réplication bactérienne, *Col*E1, permettant la réplication du vecteur dans la bactérie,
- un gène de résistance à l'ampicilline (Amp^r) pour la sélection des bactéries transformées par le plasmide,
- un gène de résistance à la puromycine ($Puro^r$) permettant la sélection des cellules transfectées,
- et, le promoteur PU6 permettant la synthèse d'ARN double brin.

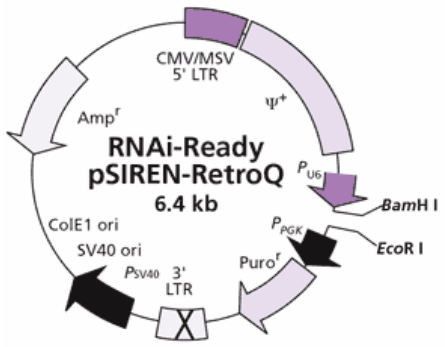


Figure 34 : Carte du plasmide pSIREN linéaire.

Les **oligonucléotides** (EurogenTec, Liège, Belgique) sont présentés dans la Figure 35 et le Tableau 10.

NRP-1 SiARN sens

5'-GATCCGGAGAGGTCCTGAATGTTCCTTCAAGAGAGGAACATTCAGGACCTCTCCTTTTTTCTAGAG-3'

1 2 3

NRP-1 SiARN antisens

5'-AATTC**TCTAG**AAAAAAGGAGAGGTCCTGAATGTTCCTCTCTTGAAGGAACATTCAGGACCTCTCCG-3'

4 5 6

Figure 35 : Séquences des oligonucléotides permettant la synthèse de siARN correspondant à l'ARNm de NRP-1.

Tableau 10 : Description des sites des oligonucléotides de la Figure 35.

Sites	Correspondance	Utilité
1	Site *Bam*H1	Insertion des oligonucléotides dans le plasmide
2	*Loop* sens	Structure en épingle à cheveux
3	Site sens *X*BaI	Vérification de l'insert dans le plasmide
4	Site *Eco*RI	Insertion des oligonucléotides dans le plasmide
5	Site antisens *X*BaI	Vérification de l'insert dans le plasmide
6	*Loop* antisens	Structure en épingle à cheveux
encadrés	6 thymines	Arrêt de la transcription de la séquence
G encadré	purine	Initiation de la transcription par la RNA polymérase III

Afin d'éliminer toute structure secondaire, les oligonucléotides (50 µM) sont placés pendant 30 s à 95°C. **L'hybridation des oligonucléotides** se fait par diminution progressive de la température (2 min à 72°C, 2 min à 37°C, 2 min à 35°C puis sur glace).

La ligation de l'oligonucléotide double brins ainsi formé, dans le vecteur pSIREN se réalise à température ambiante durant 5 min grâce à un mix réactionnel comportant 50 ng du vecteur pSIREN linéarisé, 50 ng d'oligonucléotide double brins en présence de ligase T4 (3U) (Promega, France).

I.6.2.2. Transformation d'*E Coli* TG1 par le plasmide « pSIREN NRP-1 siARN »

Les bactéries rendues compétentes par le $CaCl_2$ (50 mM, 4°C, 4 h) sont alors transformées par le plasmide pSIREN NRP-1 siARN (50 ng). Le tout est placé à 4°C pendant 30 min puis, un choc thermique est réalisé à 42°C durant 2 min. Les bactéries sont alors mises en culture dans du milieu Luria Bertani (LB), 30 min à 37°C pour permettre l'expression

phénotypique. Un étalement sur milieu LB Agar supplémenté en ampicilline (Sigma, 50 µg.mL^{-1}, 1 nuit à 37 °C) permet de sélectionner les bactéries transformées par le plasmide.

I.6.2.3. Amplification et purification du plasmide

Plusieurs colonies ont été isolées et mises en culture dans un milieu sélectif liquide à base de LB et d'ampicilline (100 µg.mL^{-1}) pendant une nuit à 37°C sous agitation. L'ADN plasmidique contenu dans chacun des clones est extrait et purifié par la méthode « minipreps » décrite par Birnboim (Birnboim, 1983), puis digéré par l'enzyme de restriction *XBaI* (Promega) pour libérer l'insert NRP-1. La taille des deux fragments d'ADN plasmidique (vecteur+ insert) est vérifiée par migration sur gel d'agarose 0,8% dans du tampon TRIS-Borate-EDTA (TBE, Invitrogen). Les bactéries transformées avec le plasmide pSIREN NRP-1 siARN sont conservés dans 10% de glycérol à - 80°C. Le plasmide pSIREN NRP-1 siARN est produit à partir de 2,5 L de culture en milieu sélectif liquide grâce au kit d'extraction NucleoBond® (Marcherey-Nagel, Düren, Allemagne), selon le protocole donné par le fournisseur. Le culot d'ADN plasmidique est resuspendu dans 1 mL d'eau RNase free. La quantité et la qualité de plasmide pSIREN NRP-1 siARN ont été respectivement mesurées par spectrophotométrie et visualisées par migration sur gel d'agarose 0,8% dans du tampon TBE. La concentration moyenne en plasmide pSIREN NRP-1 siARN obtenue après purification est d'environ 2 mg.mL^{-1}.

I.6.3. Transfection de la lignée MDA-MB-231

La lignée MDA-MB-231 est une lignée de cancer du sein surexprimant NRP-1 (Bachelder *et al.*, 2003). Les cellules à transfecter sont ensemencées en plaques 6 puits dans du RPMI-1640 sans rouge de phénol (Invitrogen) contenant 9% de SVF (serum de veau fœtal, PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Allemagne), 1% de pénicilline (10000 UI), 1% de streptomycine (10000 mg.mL^{-1}) et 1% de glutamine 200 X (Invitrogen) à raison de 100000 cellules/puits. La transfection est réalisée 24 à 48 h après ensemencement lorsque les cellules sont à 70% de confluence.

Pour chaque puits, un premier mélange est constitué de 8 µL de jetPEI™ (solution de transfection, Polyplus transfection, Eurogentec) et de 100 µL de milieu RPMI sans sérum. Un deuxième mélange est composé de 4 µg de plasmide et 100 µL de milieu RPMI sans SVF. Le mélange jetPEI™ est ensuite versé sur le mélange plasmide, puis une homogénéisation au vortex est réalisée pendant 10 s. Le tout est incubé à température ambiante pendant 30 min.

Le milieu de culture de chaque puits est changé (2 mL de milieu complet/puits pour une plaque 6 puits). Le complexe jetPEI™/plasmide (200 µL/puits) est ajouté aux cultures et le tout est placé à 37°C pendant 4 h. Les puits sont complétés avec du milieu complet pour un volume final de 4 mL.

La sélection à la puromycine (1 $\mu g.mL^{-1}$) est réalisée 24 h après transfection. Les premiers clones résistants à la puromycine apparaissent une à deux semaines après. Ils sont ensuite repiqués dans des plaques 24 puits. Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont réensemencées en T25. Après deux passages, la puromycine est éliminée, l'extraction des protéines et de l'ARN des clones sélectionnés est réalisée pour être testés respectivement par western blot et RT-PCR.

I.6.4. Caractérisation du modèle cellulaire par *reverse transcription-polymerase chain reaction* (RT-PCR)

I.6.4.1. Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux sont extraits selon la méthode de Chomczynski et Sacchi (Chomczynski et Sacchi, 1987), à l'aide du réactif TRIzol® (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) qui est une solution de phénol et d'isothiocyanate de guanidine. Le TRIzol® maintient l'intégrité des ARN lors de la dissociation des différents composants cellulaires.

Après rinçage au PBS des cellules en monocouche, 1 mL de TRIzol® est ajouté et après 1 min de contact à température ambiante, les cellules sont récupérées dans un tube RNase DNase free.

Une centrifugation à 12000 g, pendant 10 min à 4°C permet de séparer les débris cellulaires du surnageant dans lequel sont dissous les protéines, les ADN et les ARN.

Après récupération et transfert du surnageant dans un nouveau tube, 0,2 mL de chloroforme (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) sont ajoutés. Le mélange surnageant/chloroforme est agité vigoureusement (environ 15 s), puis centrifugé (12000 g pendant 15 min à 4°C). Deux phases se séparent et les ARN extraits se retrouvent exclusivement dans la phase aqueuse. Celle-ci est transférée dans un nouveau tube et 0,5 mL d'isopropanol (Prolabo, Fontenay-sous-Bois, France) sont ajoutés, afin de précipiter les ARN. Les tubes sont laissés 10 min à température ambiante, puis centrifugés à 12000 g pendant 10 min à 4°C. Les ARN totaux précipités forment un culot.

Le culot est lavé par addition de 1 mL d'éthanol à 75% (Prolabo), puis centrifugé à 7500 g pendant 5 min à 4°C. L'éthanol est ensuite éliminé par aspiration puis par évaporation en plaçant les tubes ouverts à 37°C quelques minutes (bain sec, Fisher Bioblock Scientific, Illkiich, France). Le culot est ensuite resuspendu dans 50 µL d'eau RNase DNase free.

Pour chaque échantillon, un aliquote dilué au 1/200ème est préparé puis placé dans une cuve en quartz (Merck-Eurolab, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) pour réaliser la mesure de l'absorbance à 260 nm, permettant de déterminer la concentration en ARN totaux. Cette même dilution permet d'évaluer la qualité de la préparation d'ARN par la mesure de la densité optique (DO) à 280 nm (absorbance des protéines) et le calcul du rapport R= DO_{260nm}/DO_{280nm}. La préparation est considérée de bonne qualité si R > 1,8.

Les ARN totaux sont ensuite conservé à -20°C.

I.6.4.2. Transcription inverse (*reverse transcription*, RT)

La réaction de RT permet de synthétiser un ADN complémentaire (ADNc) simple brin à partir d'un ARNm.

Un volume contenant 1 µg d'ARN totaux est déposé dans un tube à PCR de 200 µL, et complété avec de l'eau RNase DNase free pour un volume final de 11 µL. Le mélange réactionnel nécessaire à la RT, est alors ajouté dans chaque tube : 4 µL de Mix 1X Biorad, 1 µL d'Iscript RT BioRad (Iscript cDNA synthesis kit, BioRad, Ivry-sur-Seine, France) et 4 µL d'ARN RNase DNase free. Les tubes sont ensuite incubés 5 min à 25°C, 30 min à 42°C dans le thermocycleur, correspondant à la phase de synthèse des ADNc, puis 5 min à 70°C, correspondant à la phase de dénaturation de l'enzyme Iscript. Les ADNc sont conservés à -20°C jusqu'à utilisation.

I.6.4.3. Amplification en chaîne de l'ADN (*polymerase chain reaction*, PCR)

A partir des ADNc totaux, la PCR permet d'amplifier sélectivement des gènes cibles, grâce à l'utilisation d'amorces spécifiques de ces gènes d'intérêt. L'expression de chaque gène d'intérêt est évaluée de manière semi-quantitative par rapport à l'expression d'un gène de référence. Pour notre étude, nous nous sommes intéressés à l'expression du gène codant NRP-1 et nous avons utilisé le gène codant la GAPDH (glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase) comme gène de référence.

Tableau 11 : Description des amorces spécifiques utilisées pour la PCR.

Gènes cibles		Amorces (5' – 3')	Réf.	Fournisseurs
NRP-1	*sens*	ATG GAG AGG GGG CTG CCG	Bachelder *et al.*, 2003	Eurogentec
	antisens	CTA TCG CGC TGT CGG TGT A		
GAPDH	*sens*	TGG GGA AGG TGA AGG TCG GA	Bianchi *et al.*, 2002	
	antisens	GAA GGG GTC ATT GAT GGC AA		

La PCR est effectuée dans des tubes à PCR. Pour chaque tube, l'ensemble des réactifs (Invitrogen) nécessaires à l'amplification des gènes figure dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Composition du mélange pour l'amplification du gène codant NRP-1

Réactifs de PCR	Volume (µL)
ADNc	2
Tampon de PCR 10X	2
$MgCl_2$ 50 mM	0,6
dNTP 2,5 mM	1,6
Amorce sens 5 µM	2
Amorce antisens 5 µM	2
Taq DNA polymérase	0,2
H_2O (RNase DNase free)	qsp 20

Après avoir été homogénéisés et centrifugés, les tubes sont placés dans le thermocycleur permettant d'alterner les phases de dénaturation, d'appariement et de synthèse (Tableau 13).

Tableau 13 : Cycles d'amplification du gène codant NRP-1.

Etapes		Température (°C)	Durée	Nombre de cycles
Dénaturation initiale		95	15 min	1
Amplification	Dénaturation	95	30 sec	28
	Appariement	55	1 min	
	Synthèse	72	1 min	
Dégradation de la Taq polymérase		72	10 min	1
Terminaison		4	infinie	

I.6.4.4. Analyse des produits d'amplification

Les échantillons après PCR sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose.

Un gel d'agarose à 1% ($^{m}/_{v}$) est préparé par dissolution d'agarose (Invitrogen) dans du tampon TBE 0,5 X, contenant du bromure d'éthidium (BET, Sigma) à la concentration de 10 $\mu g.mL^{-1}$. Le gel est mis à polymériser dans un support adapté, d'abord à température ambiante (15 min), puis à 4°C. Deux µL de solution BlueJuice™ (Invitrogen) sont ajoutés aux produits de PCR, puis 10 µL sont déposés dans les puits pour migration.

La migration électrophorétique des produits de PCR se fait dans un tampon TBE 1X, sous 100 V pendant 2h30.

Après migration, les bandes d'ADN sont visualisées par transillumination UV grâce à la fluorescence du BET qui s'intercale dans l'ADNc. Le système d'analyse d'image utilisé est de type Gel Doc EQ (BioRad, Ivry-sur-Seine, France). Pour chaque échantillon, le rapport d'expression relative (RER) est calculé. Il représente l'intensité de fluorescence de la bande du gène cible sur l'intensité de fluorescence de la bande du gène de référence, en l'occurrence la GAPDH.

A partir de chaque solution d'ADNc, trois réactions de PCR indépendantes ont été réalisées nous permettant de déterminer un RER moyen pour chaque clone.

I.6.5. Caractérisation du modèle cellulaire par *Western-Blot*

L'expression de la protéine NRP-1 a été étudiée en utilisant la technique de *Western-Blot*.

I.6.5.1. Extraction des protéines totales

Pour éviter la dégradation des protéines par les protéases, l'extraction est réalisée continuellement dans un bac de glace à 4°C. Les cellules en monocouche sont immergées dans 1 mL de tampon de lyse dont la composition est décrite dans le Tableau 14.

Tableau 14 : Composition du tampon de lyse.

Réactifs	**Concentrations**	Fournisseurs
CHAPS 100X	1% ($^{v}/_{v}$)	Sigma
Tris-HCl	10 mM	Sigma
PMSF	100 $\mu g.mL^{-1}$	Sigma
PBS	qsp	Gibco

A la fin de l'incubation, les échantillons lysés sont centrifugés (12000g, 15 minutes, 4°C) afin d'éliminer les débris et d'obtenir un homogénat protéique.

I.6.5.2. Dosage des protéines totales

Pour chaque échantillon, le dosage des protéines totales a été effectué avec le kit *BioRad Dc Protein Assay* (BioRad, Ivry-sur-Seine, France), basé sur la méthode colorimétrique de Lowry (Lowry *et al.*, 1951).

Les échantillons à doser sont préalablement dilués au 1/10e et 1/20e dans de l'eau ppi. Une gamme de BSA (0 à 1,4 mg.mL^{-1}) diluée dans le même solvant que les échantillons, est préparée à partir d'une solution de BSA à 2 mg.mL^{-1} (Sigma) et déposée sur une plaque 96 puits (2 puits/point de gamme). Les échantillons sont déposés de la même manière. La solution A' est préparée en mélangeant 20 µL de solution S pour 1 mL de solution A (tartrate de cuivre) selon les recommandations du fournisseur. 25 µL de solution A' puis 200 µL de solution B (réactif de Folin dilué) sont déposés dans chaque puits. La plaque est alors agitée et mise à incuber pendant 15 min à température ambiante, à l'abri de la lumière. La densité optique à 690 nm est ensuite déterminée avec un lecteur de microplaque Titertek Multiscan® MCC/340 (Labsystem, Cergy-Pontoise, France).

Les extraits protéiques sont congelés et conservés à –80°C jusqu'à utilisation.

I.6.5.3. Séparation des protéines sur gels de polyacrylamide

La proportion d'acrylamide est de 7,5% dans le gel de séparation et de 5% dans le gel de concentration (Tableau 15).

Tableau 15 : Composition des gels d'acrylamide.

Réactifs	Solutions mères	Fournisseurs	**Gel de Séparation à 7,5%**	**Gel de Concentration à 5%**
Acrylamide-Bis	29 : 1 40%	BioRad	7,5%	5%
Tris-HCl	0,75M pH 8,8	Sigma	200 mM	-
Tris-HCl	0,5 M pH 6,8	Sigma	-	125 mM
Glycérol	50% ($^{v}/_{v}$)	Sigma	5%	5%
SDS	20% ($^{m}/_{v}$)	Sigma	0,16%	0,16%
Ammonium persulfate	10% ($^{m}/_{v}$)	Sigma	0,125%	0,08%
TEMED		Sigma	0,125%	0,08%
H_2O			qsp	qsp

Le gel de séparation est coulé en premier puis, recouvert d'eau saturée en isopropanol (propanol-2, Prolabo). Après 30 min de polymérisation à température ambiante, la surface du gel est rincée à l'eau puis séchée. Le gel de concentration est alors coulé, puis le peigne mis en

place permet de former les puits de dépôts. Après polymérisation, le peigne est retiré puis le bloc contenant le gel est immergé dans une cuve d'électrophorèse contenant le tampon de migration Tris-Glycine-SDS (tampon TGS, BioRad).

Les échantillons protéiques sont dilués dans du tampon de lyse (Tableau 14) contenant du dithiotréitol à 4 mM, de façon à obtenir 10 µg de protéines contenues dans 25 µL et le même volume de tampon de Laemmli (BioRad) sont ajoutés dans chaque échantillon. Les protéines ainsi préparées, sont chauffées à 95°C pendant 5 min afin de les dénaturer. Les échantillons sont ensuite placés dans un bain de glace afin d'éviter toute renaturation même partielle des protéines.

Dans chaque puits du gel d'électrophorèse, 20 µL d'échantillon sont déposés. Dans au moins un puits, 8 µL d'un marqueur de taille adapté (Kaléidoscope, Prestained Standards, BioRad) est déposé. La migration électrophorétique des protéines s'effectue à 100 V pendant 2h15 à l'aide d'un générateur Power Pac 300 (BioRad).

I.6.5.4. Transfert sur membranes

En fin de migration, le gel est démoulé et le gel de concentration retiré. Le gel de séparation est récupéré puis incubé dans le tampon de transfert (Tableau 16) pendant au mois 15 min.

Tableau 16 : Composition du tampon de transfert.

Réactifs	**Proportions**	Fournisseurs
Tris	48 mM	Sigma
Glycine	39 mM	Sigma
SDS	0,037% ($^{m}/_{v}$)	Sigma
Méthanol	20% ($^{v}/_{v}$)	Prolabo
H_2O	qsp	

Les membranes de PVDF (fluorure de polyvinylidène, GE Healthcare, Orsay, France) sont activées avant le transfert selon le protocole résumé dans le Tableau 17.

Tableau 17 : Protocole d'activation des membranes.

Solutions	**Durée d'incubation**
Méthanol	30 s
H_2O	2 min
Tampon de transfert	10 min

Le transfert est réalisé à l'aide d'un système semi-sec (TE 77 ECL Semi-dry transfer Unit, Amersham Biosciences). Les couches successives pour le transfert sont placées selon la Figure 36.

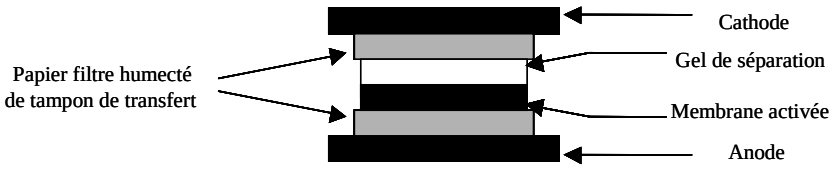


Figure 36 : Schéma du système de transfert semi-sec des protéines du gel sur la membrane.

Le transfert s'effectue à 0,08 A/membrane durant 30 min (générateur Power Pac 300, BioRad).

I.6.5.5. Immunomarquage

Pour l'immunomarquage, l'anticorps anti NRP-1 (neuropilin-1 sc-7239, Cell signaling), est dilué au 1/200e dans une solution de saturation contenant 5% de lait.

Les membranes sont incubées une nuit à 4°C, sous agitation lente, lavées dans du tampon TBST (*tris buffer saline-tween* 20), puis mises en contact avec l'anticorps secondaire (Donkey anti-goat IgG –HRP sc-2020, Cell Signaling), dilué au 1/2000e dans 5 mL de solution de saturation. Les membranes sont ensuite incubées pendant 1 h à température ambiante, avant d'être lavées de la même manière que précédemment, puis révélées.

I.6.5.6. Révélation

La révélation est réalisée avec le kit ECL™ Western Blotting (Amersham-Pharmacia Biotech, Saclay, France) dont le principe repose sur une réaction de chimioluminescence. La peroxydase couplée à l'anticorps secondaire est capable d'oxyder le luminol (réactif du kit ECL™) et aboutit à l'émission de lumière, imprimant un film d'autoradiographie adapté (Hyperfilm™ ECL, Amersham-Pharmacia Biotech).

Les membranes sont délicatement séchées puis mises en contact pendant 1 min avec 6 mL de solution de révélation (provenant d'un mélange équivolume des deux réactifs fournis dans le kit ECL™). Les membranes sont ensuite délicatement séchées avec du papier absorbant, enveloppées de papier film puis mises en contact avec le film photographique dans une cassette de type Hypercassette™ (Amersham-Pharmacia Biotech). Le temps d'exposition

est d'environ 2 min, puis les films sont développés automatiquement (développeur 3M, modèle XP2000) dans le Service de Radiologie du Centre Alexis Vautrin.

I.7 Cinétiques d'incorporation des photosensibilisateurs dans la lignée NRP-1 négative

Les cellules MDA-MB-231 ou MDA-MB-231 NRP-1 siARN ont été ensemencées dans des plaques 96 puits (2.10^4 cellules/puits) dans du milieu RPMI contenant 9% de SVF. Deux plaques par lignée ont été préparées. Après trois jours de croissance, les cellules (12 puits par condition) sont mises en présence des PSs (5 µM) pendant 24 h dans du milieu RPMI contenant 0,5% de SVF. Parallèlement, une plaque est utilisée pour évaluer la viabilité cellulaire par test MTT, l'autre plaque est utilisée pour tester l'incorporation cellulaire.

Le **test MTT** est une méthode colorimétrique, utilisant le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium ou MTT (Sigma), qui permet de mesurer la prolifération cellulaire. Le MTT est un composé jaune pâle métabolisé par la succinate déshydrogénase mitochondriale dans les cellules vivantes. La métabolisation entraîne la formation de cristaux de formazan, de coloration brune.

Au moment de la réalisation du test, 50 µL d'une solution de MTT (2,5 $mg.mL^{-1}$ dans du PBS) est ajouté dans chaque puits. Après 3 h d'incubation à 37°C, nécessaires à la métabolisation du colorant, l'intégrité des membranes cellulaires est détruite par addition de 50 µL de SDS (dodécylsulfate de sodium) à 25% ($^m/_v$) (Sigma). Après homogénéisation du milieu dans chaque puits, l'absorbance à 540 nm est déterminée à l'aide d'un lecteur de microplaques Titertek Multiscan® MCC/340.

Pout tester l'incorporation cellulaire, les cellules sont rincées trois fois avec du PBS, puis 50 µL de tampon de lyse (NaOH 0,25M et SDS 1%) et 150 µL d'éthanol sont ajoutés dans chaque puits. Les débris cellulaires sont éliminés par centrifugation (2000 rpm, 10 min) puis le surnageant est placé dans une nouvelle plaque pour évaluer la fluorescence à 650 nm après excitation à 410 nm grâce à un spectrofluorimètre permettant la lecture directe en plaque 96 puits (flx-Xenius spectrofluorimeter, SAFAS, Monaco).

I.8 Biodistribution et stabilité des PSs chez la souris

I.8.1. Modèle animal

Des souris athymiques nu/nu (Harlan, Borchen) femelles de 6 semaines ont été xénogreffées à partir de fragments tumoraux (U87), provenant d'une souris donneuse. Entre 14 et 21 jours après greffage, les tumeurs atteignent un diamètre moyen de 5 mm. Les PSs (TPC-Ahx-ATWLPPR, TPC-Ahx-aTWLPPR ou TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR) à la dose de 2,8 mg/kg (analyse par HPLC) ou 5,6 mg/kg (analyse par MALDI TOF) sont injectés par voie intra-veineuse dans la veine de la queue des souris. Les différents PSs sont dilués dans un mélange éthanol/PEG 400/eau (2:3:5, v/v/v). Les animaux sont ensuite maintenus à l'obscurité.

Les étapes suivantes ont été réalisées 1, 2, 4 ou 24 heures après injection par voie intra-veineuse des PSs. Le sang de l'animal est prélevé par ponction intra-cardiaque, la tumeur et le foie sont également soigneusement récupérés.

Le sang est prélevé dans des tubes héparinisés. Après centrifugation à 400 g pendant 10 min, le plasma est récupéré dans des cryotubes et conservé à -80 °C. Après un rapide rinçage dans du sérum physiologique, le foie et la tumeur sont également conservés à -80°C dans des cryotubes.

I.8.2. Chromatographie liquide haute performance et spectrométrie de masse

I.8.2.1. Extraction des photosensibilisateurs

Avant extraction, les différents échantillons sont pesés. Les tissus sont solubilisés dans un tampon Tris-EDTA-Molybdate (500 µL ; pH 7,4) avant d'être broyés à l'ultraturax et passés aux ultrasons.

Les PSs sont solubilisés dans du DMSO (50 µL) et les protéines sont précipitées par du méthanol (2,5 mL). Après homogénéisation le surnageant est récupéré puis, évaporé sous vide (Speed vac).

Les échantillons sont repris dans 50 µL d'éthanol pour l'analyse par spectrométrie de masse et dans 200 µL de méthanol pour l'analyse chromatographique.

I.8.2.2. Chromatographie analytique (HPLC en phase inverse)

L'HPLC en phase inverse sur colonne C18 (250 x 4,6 mm,YMC Interchim, Montluçon France) est réalisée sur un système Gold Beckman Coulter (France) constitué d'une pompe 126 associée à un injecteur automatique e506 Beckman Coulter. Un détecteur

spectrofluorimétrique RF-10A XL (Shimadzu, Champs s/Marne, France) est directement couplé au système HPLC. Nous avons travaillé en condition isocratique avec un solvant d'élution constitué d'un mélange méthanol-eau (90:10, $^{v}/_{v}$). Le débit est maintenu à 1 $mL.min^{-1}$, le volume d'injection est fixé à 50 µL et la durée d'analyse à 40 min.

La détection des PSs est réalisée par fluorescence avec comme longueurs d'onde d'excitation et d'émission respectivement 416 nm et 652 nm.

Nous avons choisi d'utiliser la *m*THPP comme standard interne à la concentration initiale de 250 $ng.mL^{-1}$. Ainsi, la *m*THPP a été ajoutée systématiquement avant toute extraction plasmatique et tissulaire afin de vérifier la reproductibilité de l'extraction pour chaque échantillon. De plus, pour chaque série d'échantillons inconnus de souris à quantifier, quatre points de gamme de PS (100, 250, 500 et 1000 $ng.mL^{-1}$) ont été également réalisés et extraits à partir du plasma ou du tissu témoin supplémenté afin de vérifier la reproductibilité du protocole d'extraction. Les concentrations plasmatiques et tissulaires sont calculées à partir des droites de calibration obtenues après extraction, puis corrigées par rapport à la moyenne des aires de l'étalon interne.

II. Résultats et Discussion

II.1 Structure des peptides, pseudopeptide et chlorine conjuguées

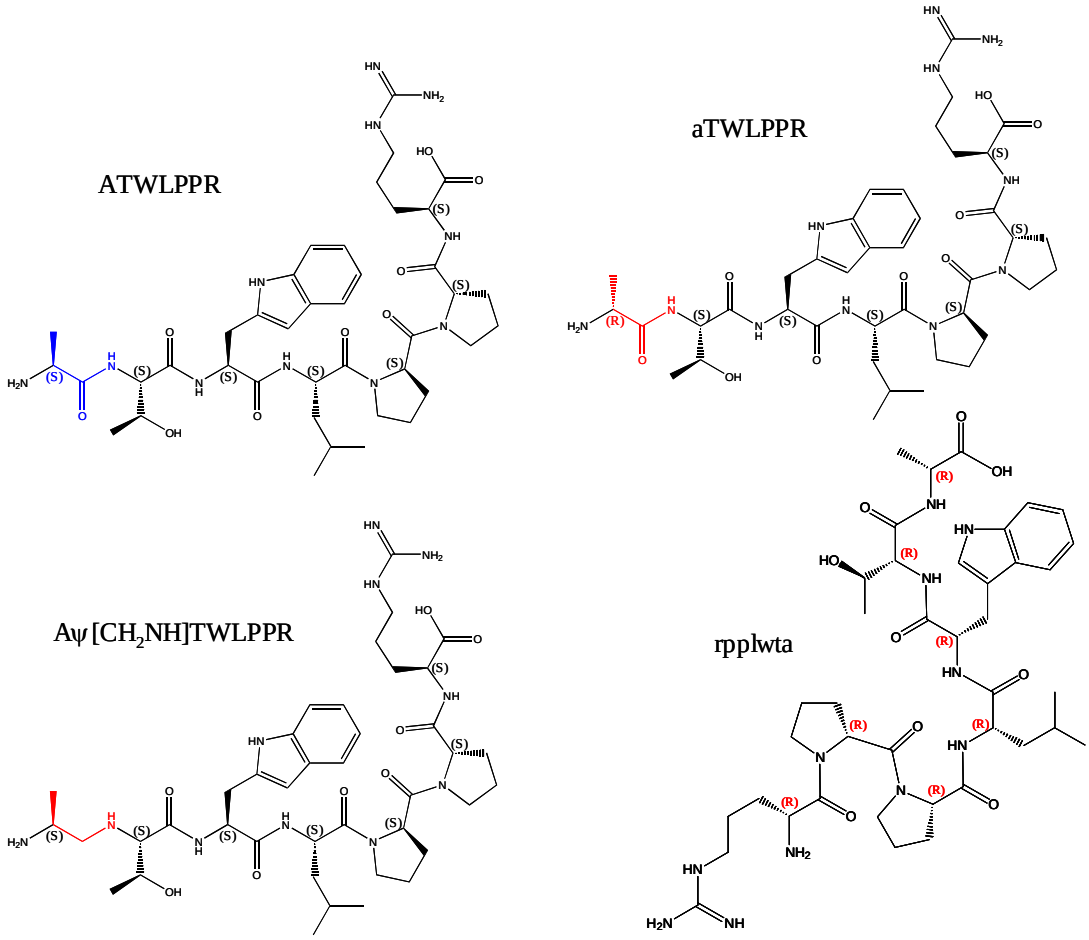


Figure 37 : Structure chimique des peptides et pseudopeptide ATWLPPR, aTWLPPR, Aψ[CH_2NH]TWLPPR et rpplwta.

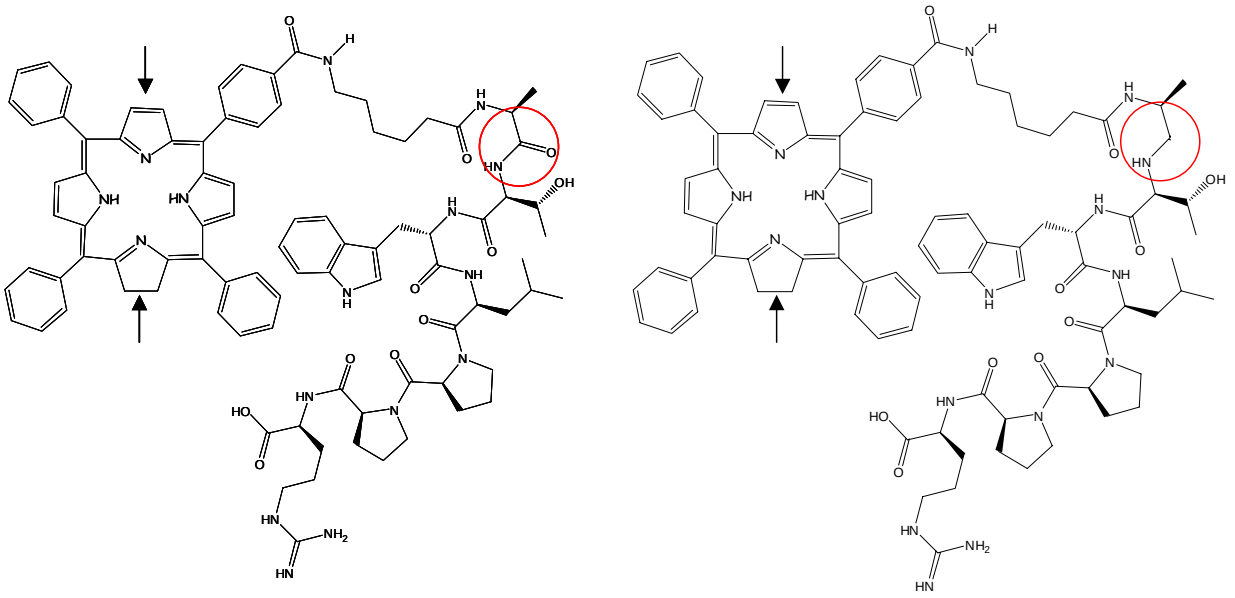


Figure 38 : Structure chimique des chlorines conjuguées TPC-Ahx-ATWLPPR et TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR

Il existe deux isomères pour chacune de ces molécules, correspondant à la réduction d'une double liaison à l'un des emplacements indiqués par les flèches. Un seul isomère est représenté ici.

II.2 Caractérisations chimiques des peptides et pseudopeptide seuls et conjugués à la TPC après purification

Suite au clivage des (pseudo)peptides du support solide, le mélange obtenu contient la molécule d'intérêt ((pseudo)peptide ou la TPC couplée au ((pseudo)peptide), mais peut également être composé d'autres peptides, notamment des peptides présentant des délétions et des peptides ayant subi des modifications sur les chaînes latérales. Nous avons donc effectué une purification par HPLC en phase inverse, avec une colonne semi-préparative RP-18. Les peptides sont purifiés en utilisant un gradient d'eau-TFA 0,1 % ($^{v}/_{v}$) (A) et d'acétonitrile (B) (25 à 100% de B en 30 min), avec un débit de 4 mL.min^{-1} et une détection à 280 nm. Les PSs couplés aux peptides ou pseudopeptide sont purifiés sur la même colonne avec un gradient d'eau-TFA 0,1 % ($^{v}/_{v}$) (A) et de méthanol (B) (75 à 100 % de B en 15 min puis 100 % de B), avec détection par absorbance à 415 nm.

II.2.1. Spectres RMN du proton

L'identité des (pseudo)peptides seuls et conjugués à la TPC après purification a été vérifiée par RMN du proton, en solution dans du DMSO deutéré.

Tableau 18 : Déplacements chimiques des protons de ATWLPPR dans le DMSO deutéré (ppm).

	NH	α-H	β-H	γ-H	δ-H	autres
Ala		3,95	1,05 ; 1,03			
Thr	8,36	3,95	4,33	1,04		
Trp	7,88	4,56	3,10 ; 3,01			5H=6,95 ; 2H,6H=6,97 ; 7H=7,30 4H=7,53 ; 1H=10,79
Leu	8,11	4,53	1,27 ; 1,24	1,58	0,86	
Pro		4,53	2,10 ; 1,90	1,80	3,49	
Pro		4,33	2,00 ; 1,80	1,90	3,56	
Arg	8,00	4,13	1,82	1,52	3,10	ε-NH=7,52

Tableau 19 : Déplacements chimiques des protons de aTWLPPR dans le DMSO deutéré (ppm).

	NH	α-H	β-H	γ-H	δ-H	autres
ala	8,02 (NH_3^+)	4,02	1,34			
Thr	8,41	3,96	4,39	1,02		
Trp	8,07	4,65	3,17 ; 2,95			5H=6,91 ; 6H=7,07 ; 2H=7,15 ; 7H=7,32 ; 4H=7,59 ; 1H=10,80
Leu	8,12	4,57	1,42 ; 1,38	1,61	0,84	
Pro		4,55	2,10 ; 1,90	1,81	3,44	
Pro		4,36	2,07 ; 1,80	1,87	3,63	
Arg	8,01	4,16	1,75	1,55	3,13	ε-NH=7,56

Tableau 20 : Déplacements chimiques des protons de Aψ[CH_2NH]TWLPPR dans le DMSO deutéré (ppm).

	NH	α-H	β-H	γ-H	δ-H	autres
redAla		3,53	0,95			2,88 ; 2,78 (CH_2 réd.)
Thr	8,10	3,51	3,84	1,19		
Trp	8,31	4,58	3,13 ; 2,94			5H=6,99 ; 6H=7,08 ; 2H=7,15 =7H=7,35; 4H=7,69 ; 1H=10,78
Leu	8,16	4,58	1,47 ; 1,40	1,68	0,88	
Pro		4,54	2,05 ; 2,01	1,75	3,51	
Pro		4,39	2,12 ; 2,02	1,81	3,63	
Arg	8,04	4,19	1,74	1,58	3,12	ε-NH=7,58

Tableau 21 : Déplacements chimiques des protons de rpplwta (rétro-inverso) dans le DMSO deutéré (ppm).

	NH	α-H	β-H	γ-H	δ-H	autres
arg	8,01	4,45	1,72	1,59	3,07	ε-NH=7,68
pro		4,39	1,92	1,84	3,64	
pro		4,65	2,21 ; 1,95	1,81	3,44	
leu	7,80	4,21	1,58 ; 1, 36	1,58	0,80	
trp	7,78	4,51	9,19 ; 3,10			5H=6,88 ; 6H=6,71 ; 2H=7,12 ; 7H=7,35 ; 4H=7,53 ; 1H=10,83
thr	7,88	4,20	3,98	1,05		
ala	8,19	4,25	1,21			

Tableau 22 : Déplacements chimiques des protons de TPC-Ahx-ATWLPPR dans le DMSO deutéré (ppm).

	NH	α-H	β-H	γ-H	δ-H	autres
TPC						-1,52 ; -1,58 (NH-pyrrole) ; 7,24-8,84 (ArH, pyrrole)
Ahx	8,75					c=1,50 ; b,d=1,67 ; a=2,22 ; e=3,41
Ala	8,13	4,39	1,27			
Thr	7,64	4,22	4,09	1,00		
Trp	7,89	4,55	3,13 ; 3,11			7,53-6,90 (ArH) ; 2H=7,15 1H=10,73
Leu	8,02	4,50	1,48 ; 1,29	1,59	0,87	
Pro		4,57	2,15 ; 1,81	1,78	3,45	
Pro		4,33	2,08 ; 1,92	1,82	3,61	
Arg	8,07	4,15	1,72	1,55	3,13	ε-NH=7,45

Tableau 23 : Déplacements chimiques des protons de TPC-Ahx-aTWLPPR dans le DMSO deutéré (ppm).

	NH	α-H	β-H	γ-H	δ-H	autres
Chl						-1,58, -1,53 (NH-pyrrole), 7,30-8,40 (ArH, pyrrole)
Ahx	8,72					c=1,48 ; b,d=1,69 ; a=2,20 ; e=3,39
ala	8,11	4,36	1,22			
Thr	7,75	4,13	4,01	1,21		
Trp	8,85	4,53	3,19 ; 3,02			7,55-6,85 (ArH) ; 2H=7,15 1H=10,76
Leu	7,91	4,51	1,48 ; 1,32	1,61	0,89	
Pro		4,54	2,12 ; 1,79	1,78	3,42	
Pro		4,38	2,01 ; 1,88	1,79	3,59	
Arg	8,01	4,12	1,74	1,51	3,09	ε-NH=7,49

Tableau 24 : Déplacements chimiques des protons de TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR dans le DMSO deutéré (ppm).

	NH	α-H	β-H	γ-H	δ-H	autres
Chl						-1,52, -1,59 (NH-pyrrole), 7,23–8,57 (ArH, pyrrole)
Ahx	8,75					c=1,42 ; b,d=1,65 ; a=2,18 ; e=3,40
redAla	7,93	3,81	0,98			2,20 ; 2,39 (CH_2 réd.)
Thr	7,19	3,55	3,72	1,09		
Trp	8,91	4,84	3,15 ; 2,95			6,80-7,70 (ArH) ; 2H=7,17 1H=10,78
Leu	8,36	4,61	1,60 ; 1,41	1,62	0,91	
Pro		4,51	2,40 ; 2,05	1,78	3,41	
Pro		4,33	2,01 ; 1,83	1,79	3,57	
Arg	8,03	4,13	1,72	1,55	3,11	ε-NH=7,56

Les déplacements chimiques des acides aminés des nouveaux peptides seuls ou couplés au PS (Tableaux 19, 20, 23 et 24) sont comparables à ceux obtenus pour le peptide ATWLPPR (Tableaux 18 et 22).

II.2.2. Analyse chromatographique par HPLC

Les PSs ont été caractérisés par HPLC en phase inverse, avec une colonne semi-préparative RP-18 (250 × 10 mm, 5 µm, Apollo Alltech) avec un gradient d'eau-TFA 0,1 % ($^{v}/_{v}$) (A) et de méthanol (B) (75 à 100 % de B en 15 min puis 100 % de B), avec détection par absorbance à 415 nm.

On peut noter que la TPC couplée aux (pseudo)peptides est éluée sous forme d'un double pic en HPLC (Tableau 25) du fait de l'existence de deux isomères de cette molécule, résultant de son caractère asymétrique (Figure 38 page 168).

Tableau 25 : Temps de rétention moyen (min) des PSs conjugués.

	TPC-Ahx-ATWLPPR	TPC-Ahx-aTWLPPR	TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR
Pic 1	17,2	17,2	16,0
Pic 2	17,9	17,9	16,8

Les trois PSs possèdent des caractéristiques chimiques comparables avec cependant une légère différence de valeur de temps de rétention pour la TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR certainement due à la réduction de la liaison amide entre les résidus Ala et Thr (Tableau 25).

II.2.3. Spectres de masse des PSs couplés aux peptides

La vérification des structures chimiques de la TPC-Ahx-ATWLPPR, la TPC-Ahx-aTWLPPR et la TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR a été faite par spectrométrie de masse MALDI-TOF (*matrix-assisted laser desorption ionization –time of flight*).

D'après les résultats de la masse, les PSs couplés aux (pseudo)peptides sont purs après purification HPLC (Tableau 26 et Figure 39).

Tableau 26 : Comparaison des masses des PSs calculées et obtenues.

	Masses calculées (m)	[Masses obtenues + H]$^{+}$ (m/z)
TPC-Ahx-ATWLPPR	1594,79	1595,61
TPC-Ahx-aTWLPPR	1594,79	1595,59
TPC-Ahx-Aψ[C_{H2}NH]TWLPPR	1580,81	1582,51

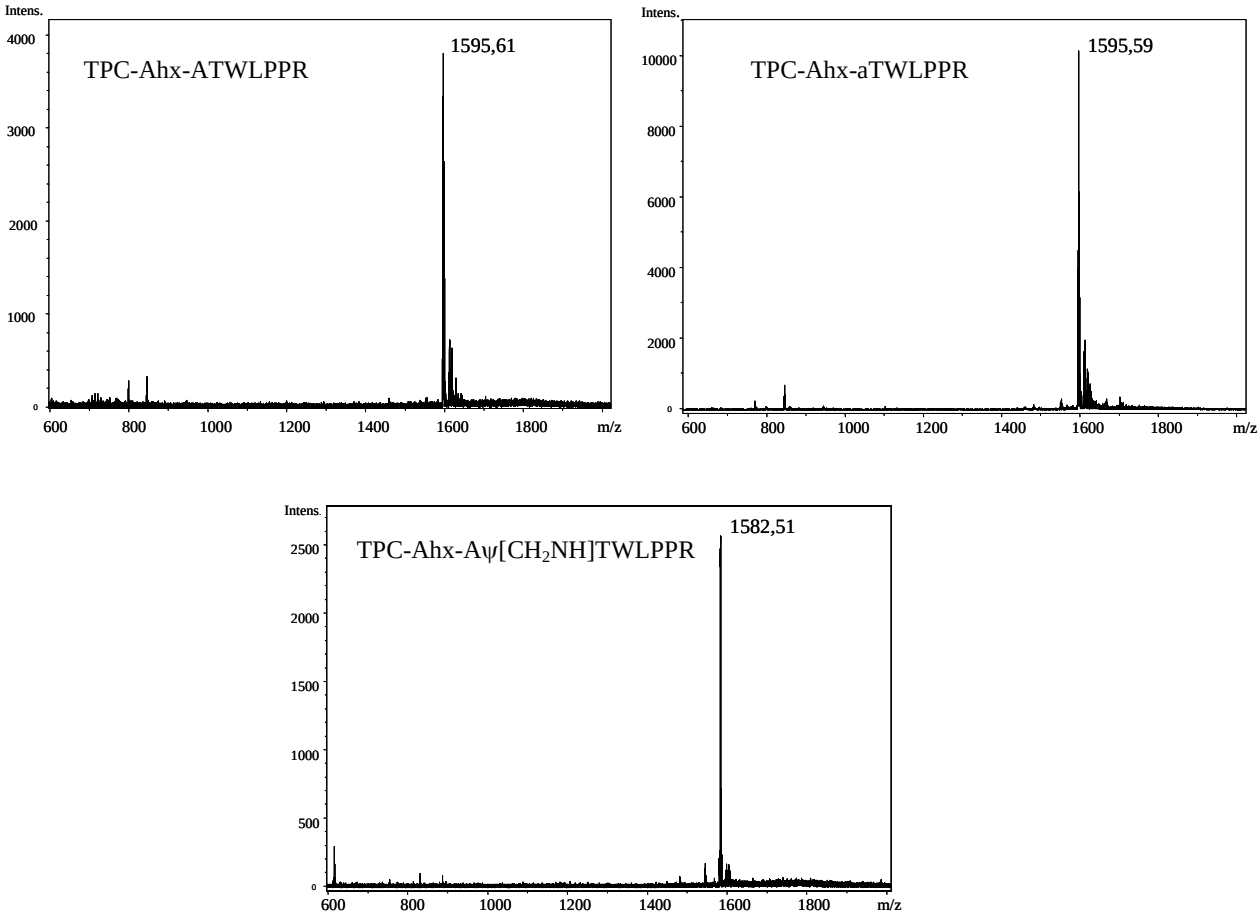


Figure 39 : Spectres de masse des PSs après purification HPLC.

II.3 Caractéristiques photophysiques des PSs

Les spectres d'absorption des PSs dans l'éthanol sont représentés sur la Figure 40. Ils sont caractéristiques des chlorines, avec un élargissement de la bande de Soret (non observé pour les porphyrines), et quatre bandes Q dont la plus forte absorbe à 651 nm (bande Q_I). Les profils d'absorption sont conservés entre la TPC-Ahx-aTWLPPR, la TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR et la TPC-Ahx-ATWLPPR.

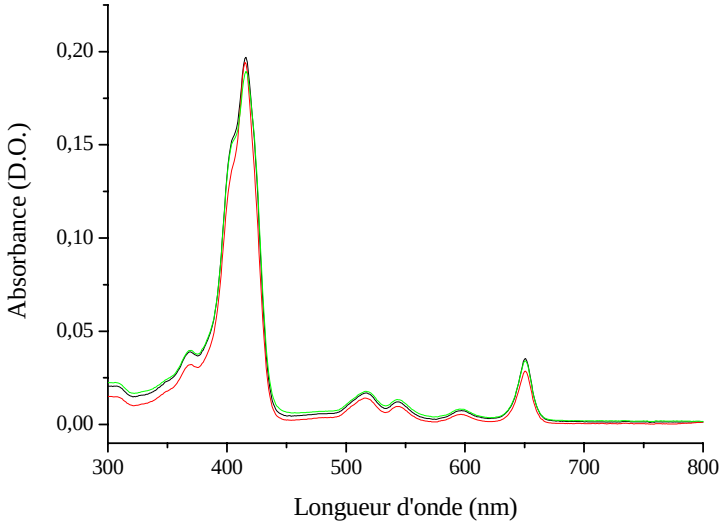


Figure 40 : Spectres d'absorption des PSs dans l'éthanol. TPC-Ahx-ATWLPPR (en noir), TPC-Ahx-aTWLPPR (en rouge) et TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR (en vert).

Les **rendements quantiques de fluorescence (Φ_{fluo}) et d'oxygène singulet** (Φ_{Δ}) sont également conservés entre les trois PSs. Les valeurs obtenues sont présentées dans le Tableau 27.

Tableau 27 : Propriétés photophysiques des PSs dans l'éthanol.

	Φ_{fluo}	Φ_{Δ}
TPC-Ahx-ATWLPPR	0,18	0,68
TPC-Ahx-aTWLPPR	0,16	0,63
TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR	0,23	0,72

Ainsi, les trois PSs présentent des propriétés chimiques similaires (RMN et masse) et des caractéristiques photophysiques équivalentes (spectres d'absorbance, rendements quantiques de fluorescence et d'oxygène singulet). De plus, ils se caractérisent par des temps de rétention en HPLC phase inverse également comparables (Tableau 25). D'après ces mesures, les concentrations en PSs ont été évaluées à partir des coefficients d'extinction molaires obtenus précédemment pour la TPC-Ahx-ATWLPPR : 74.10^3 $M^{-1}.cm^{-1}$ pour la bande de Soret (416 nm) et 15.10^3 $M^{-1}.cm^{-1}$ pour la bande Q_I (652 nm) (Tirand *et al.*, 2006).

II.4 Affinité des peptides vis-à-vis des récepteurs et co-récepteurs au $VEGF_{165}$ par test de *binding*

Dans un premier temps, les peptides seuls ont été testés pour une seule concentration (480 mM) sur les protéines chimériques recombinantes (NRP-1, NRP-2 et Flt-1). Ces résultats sont présentés dans la Figure 41. L'affinité des peptides modifiés n'a pas été testée sur KDR car nous avions préalablement mis en évidence que ATWLPPR ne reconnaissait pas ce récepteur (Tirand *et al.*, 2006).

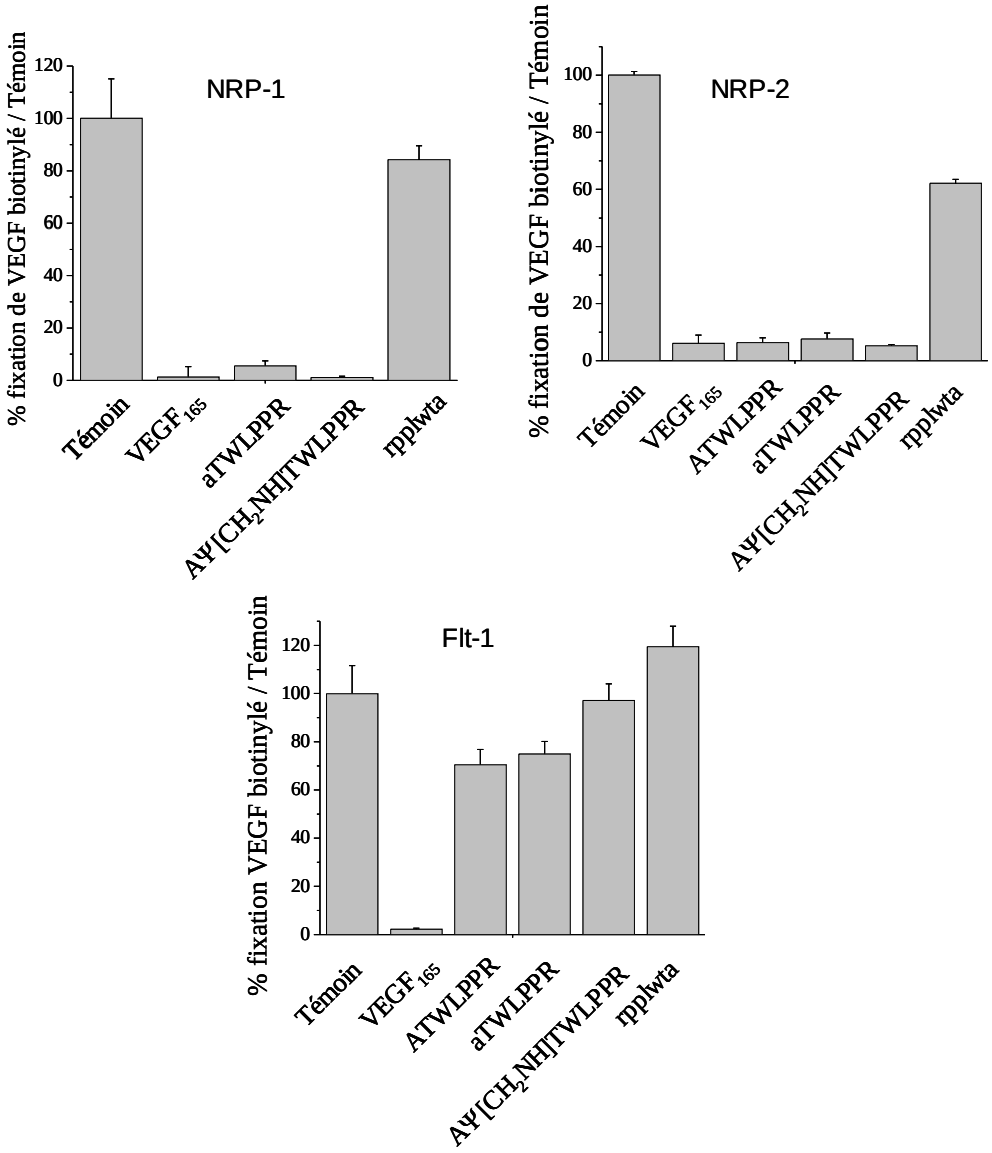


Figure 41 : Affinité des différents peptides vis-à-vis des récepteurs au VEGF : NRP-1, NRP-2 et Flt-1.

La fixation du VEGF biotinylé (respectivement 5, 10 et 5 $ng.mL^{-1}$) sur les protéines recombinantes (respectivement 2, 5 et 2 $\mu g.mL^{-1}$) en présence de 2 $\mu g.mL^{-1}$ d'héparine est évaluée en absence (témoin) ou présence de peptide (480 µM) ou de $VEGF_{165}$ (respectivement 0,5 ; 1,0 ou 0,5 $\mu g.mL^{-1}$). Les données représentent les moyennes ± écart-type, n=3.

Les peptides ATWLPPR, aTWLPPR et Aψ[CH_2NH]TWLPPR déplacent le $VEGF_{165}$ biotinylé de sa fixation sur les récepteurs NRP-1 et NRP-2 contrairement au peptide rpplwta qui n'est pas affin vis-à-vis de ces récepteurs. Aucun des peptides testés ne reconnaît le récepteur Flt-1. Nous avons également démontré sans ambiguïté l'absence de liaison du peptide *inverso* RPPLWTA sur NRP-1 (données non montrées).

Suite à ces études d'affinité, aTWLPPR et Aψ[CH_2NH]TWLPPR ont été testés par comparaison au peptide ATWLPPR, sur NRP-1 et NRP-2 à différentes concentrations allant de 3 à 120 µM afin d'évaluer la concentration peptidique permettant de déplacer 50% de VEGF biotinylé (EC_{50}). Ces résultats sont présentés sur la Figure 42 et dans le Tableau 28.

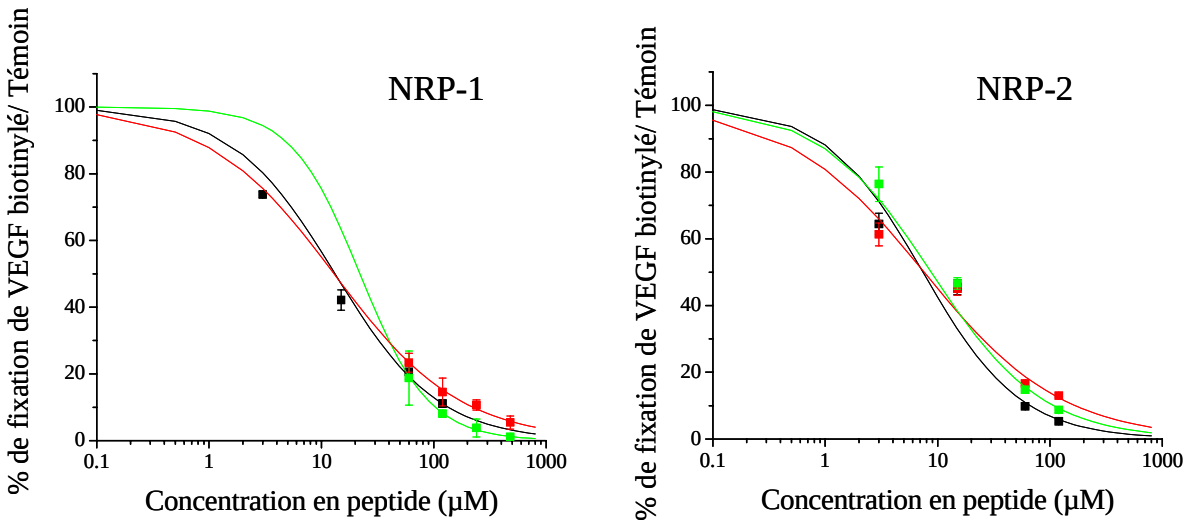


Figure 42 : Déplacement du VEGF biotinylé sur NRP-1 et NRP-2 en fonction de la concentration en peptide : ATWLPPR (noir), aTWLPPR (rouge) et Aψ[CH_2NH]TWLPPR (vert).

La fixation du VEGF biotinylé (respectivement 5 et 10 $ng.mL^{-1}$) sur les protéines recombinantes NRP-1 et NRP-2 (respectivement 2 et 5 $\mu g.mL^{-1}$) en présence de 2 $\mu g.mL^{-1}$ d'héparine est évaluée par un ajout croissant de peptide (3 - 480 µM). Les données représentent les moyennes ± écart-type, n=3.

Quel que soit le peptide étudié, les affinités moléculaires vis-à-vis des co-récepteurs NRP-1 ou NRP-2 demeurent comparables (voir Tableau 28). Les modifications structurales de aTWLPPR et Aψ[CH_2NH]TWLPPR n'altèrent donc pas leur reconnaissance vis-à-vis des NRPs. Les EC_{50} pour NRP-1 sont de 13,2 µM pour ATWLPPR (contre 19 µM dans les précédents travaux (Tirand *et al.*, 2006)) et de 13,0 et 22,0 µM, respectivement pour aTWLPPR et Aψ[CH_2NH]TWLPPR (Tableau 28).

Les peptides aTWLPPR et Aψ[CH_2NH]TWLPPR conjugués *via* le bras espaceur (Ahx) à la TPC ont également été testés pour ces co-récepteurs NRP-1 et NRP-2 à différentes concentrations (10 µM à 1 mM) (Figure 43).

Les EC_{50} obtenues pour les trois PSs vis-à-vis de NRP-1 et NRP-2 sont là encore du même ordre de grandeur, ces résultats sont présentés dans le Tableau 28.

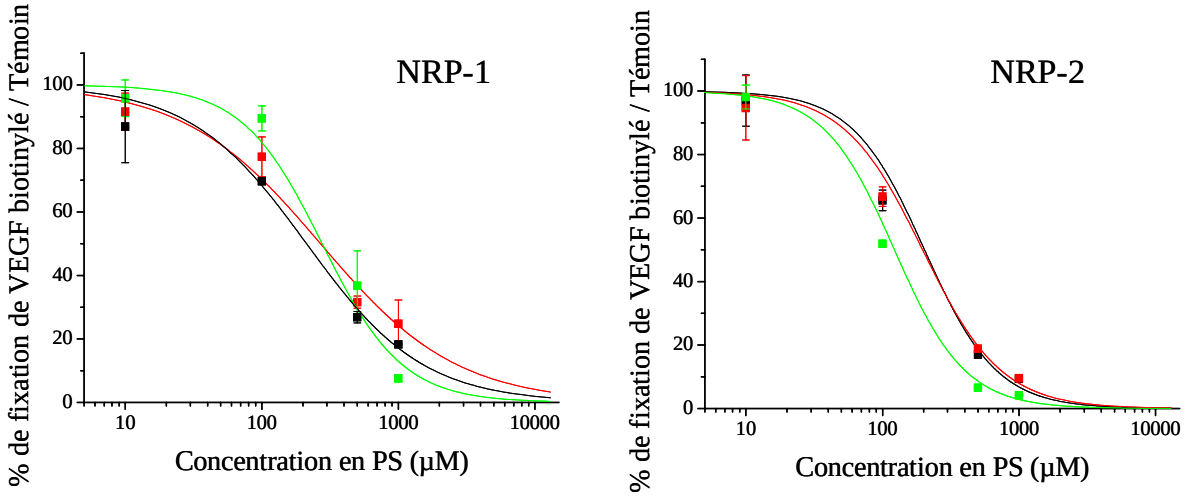


Figure 43 : Déplacement du VEGF biotinylé sur NRP-1 et NRP-2 en fonction de la concentration en chlorine conjuguée : TPC-Ahx-ATWLPPR (noir), -aTWLPPR (rouge) et –Aψ[CH_2NH]TWLPPR (vert).

La fixation du VEGF biotinylé (respectivement 5 et 10 ng.mL^{-1}) sur les protéines recombinantes NRP-1 et NRP-2 (respectivement 2 et 5 µg.mL^{-1}) en présence de 2 µg.mL^{-1} d'héparine est évaluée par ajout croissant de PS (10-1000 µM). Les données représentent les moyennes ± écart-type, n=3.

Tableau 28 : Concentrations en ligand compétiteur permettant de déplacer 50% du VEGF biotinylé (EC_{50}) pour les différents peptides conjugués ou non à la chlorine, sur les co-récepteurs NRP-1 et NRP-2.

		NRP-1		NRP-2
		EC_{50} (µM)	Tirand *et al.*, 2006	EC_{50} (µM)
Peptides seuls	**ATWLPPR**	**13**	**19**	7
	aTWLPPR	13		8
	Aψ[CH_2NH]TWLPPR	22		9
Peptides conjugués à la chlorine (TPC)	**TPC-Ahx-ATWLPPR**	**213**	**171**	203
	TPC-Ahx-aTWLPPR	269		197
	TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR	277		122

Le fait que les peptides *inverso* (RPPLWTA) et *rétro-inverso* (rpplwta) ne présentent pas d'affinité vis-à-vis de NRP-1, confirme l'hypothèse que le résidu arginine est indispensable à la reconnaissance du récepteur. En effet, il a été démontré que l'arginine (fonction COOH et chaîne latérale) est indispensable à la spécificité de reconnaissance vis-à-vis de NRP-1 (Starzec *et al.*, 2007). Ainsi, pour les peptides *inverso*, la position de l'arginine dans la chaîne peptidique ne permettrait pas la liaison au co-récepteur.

Les différents peptides testés ne se lient, ni au VEGFR-2 (Flt-1/KDR), ni au VEGFR-1 (Flk-1). Le fait que ces deux récepteurs possèdent 50% d'homologie au niveau de leur

séquence d'acides aminés ainsi que des similitudes structurales (Yamazaki et Morita, 2006b) peut expliquer ce résultat. La séquence terminale de ATWLPPR (PPR) présente une similarité de séquence avec l'exon 8 du VEGF (PRR) (Starzec *et al.*, 2007) qui lui même est impliqué dans la reconnaissance du VEGF-A avec les NRPs mais pas avec les VEGFRs. En effet, il a été récemment démontré, par dynamique moléculaire, que ATWLPPR se fixe à la région b1 de NRP-1 (Starzec *et al.*, 2007). De plus, NRP-1 et NRP-2 possèdent deux domaines b1-NRP dont l'un correspond au site de liaison de l'exon 8 du VEGF (Appleton *et al.*, 2007). Ainsi, les peptides affins pour NRP-1 le sont également pour NRP-2.

II.5 Comparaison de l'incorporation cellulaire des conjugués

Nous utilisons ici la lignée MDA-MB-231 et son clone sélectionné dont l'expression de NRP-1 a été diminuée grâce à une technique d'ARN interférence. Les cellules transfectées par le plasmide notées NRP-1 siARN ont été sélectionnées en milieu contenant de la puromycine, le modèle a été validé par Western Blot et RT-PCR. Pour les cellules sélectionnées, l'expression de la protéine NRP-1 a été inhibée en moyenne de 46% (Figure 44) et l'expression des ARNm de 44% (Figure 45).

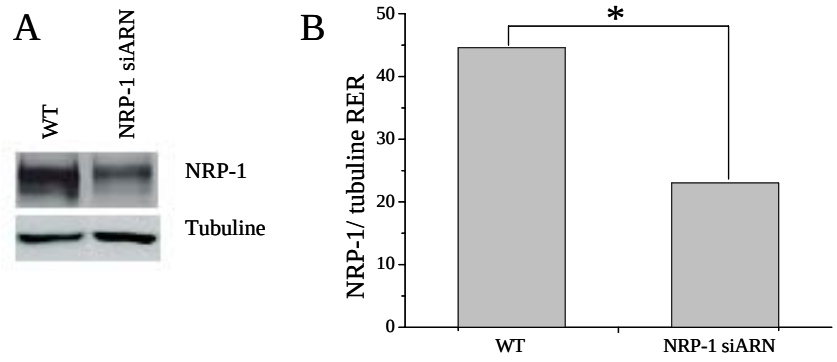


Figure 44 : A. Analyse de l'expression protéique de NRP-1 par Western Blot pour les cellules MDA-MB-213 sauvages (WT) et celles transfectées par le plasmide pSIREN (NRP-1 siARN). B. Rapport d'expression relative (RER). n=2, * p< 0,05.

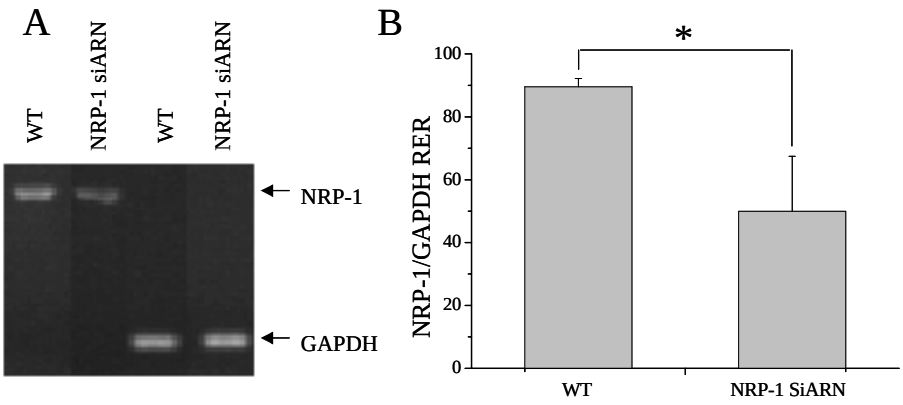


Figure 45 : A. Analyse de l'expression des transcrits par RT-PCR des MDA-MB-213 sauvages (WT) et transfectées par le plasmide pSIREN (NRP-1 siARN). B. Rapport d'expression relative (RER), n=3, * p< 0,05.

Pour la lignée sauvage sur-exprimant le co-récepteur NRP-1, les taux d'incorporation après 24 h de contact avec les trois PSs sont 10 à 25 fois plus faibles pour la TPC seule que pour les conjugués (Figure 46), ce qui confirme l'implication des peptides dans l'incorporation cellulaire médiée par NRP-1.

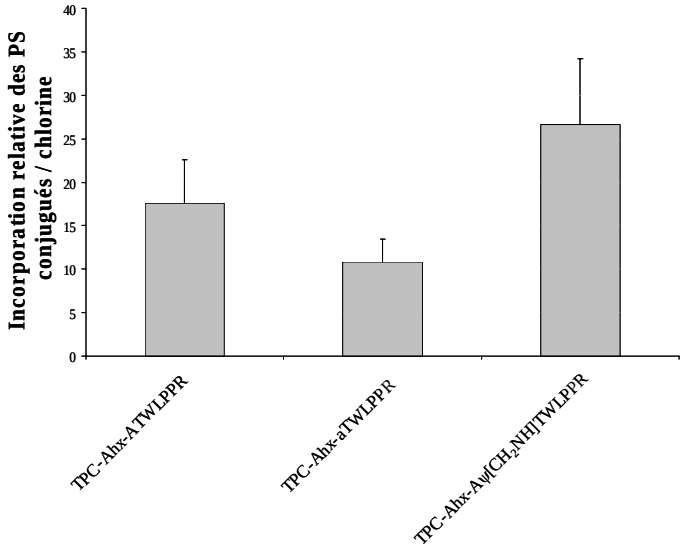


Figure 46 : Pourcentage d'incorporation des PSs conjugués par rapport à celui de la chlorine après 24 h d'incubation pour la lignée MDA-MB-231 sauvage.

Les cellules ont été incubées en présence de 5 µM de PSs. Les intensités de fluorescence intracellulaire après extraction ont été mesurées à 652 nm après excitation à 415 nm. L'intensité de fluorescence des PSs a été rapportée à la quantité de cellules évaluée par un test MTT. Les données représentent les moyennes ± écart-type des valeurs relatives normalisées par rapport à la fluorescence mesurée pour la chlorine, n=12.

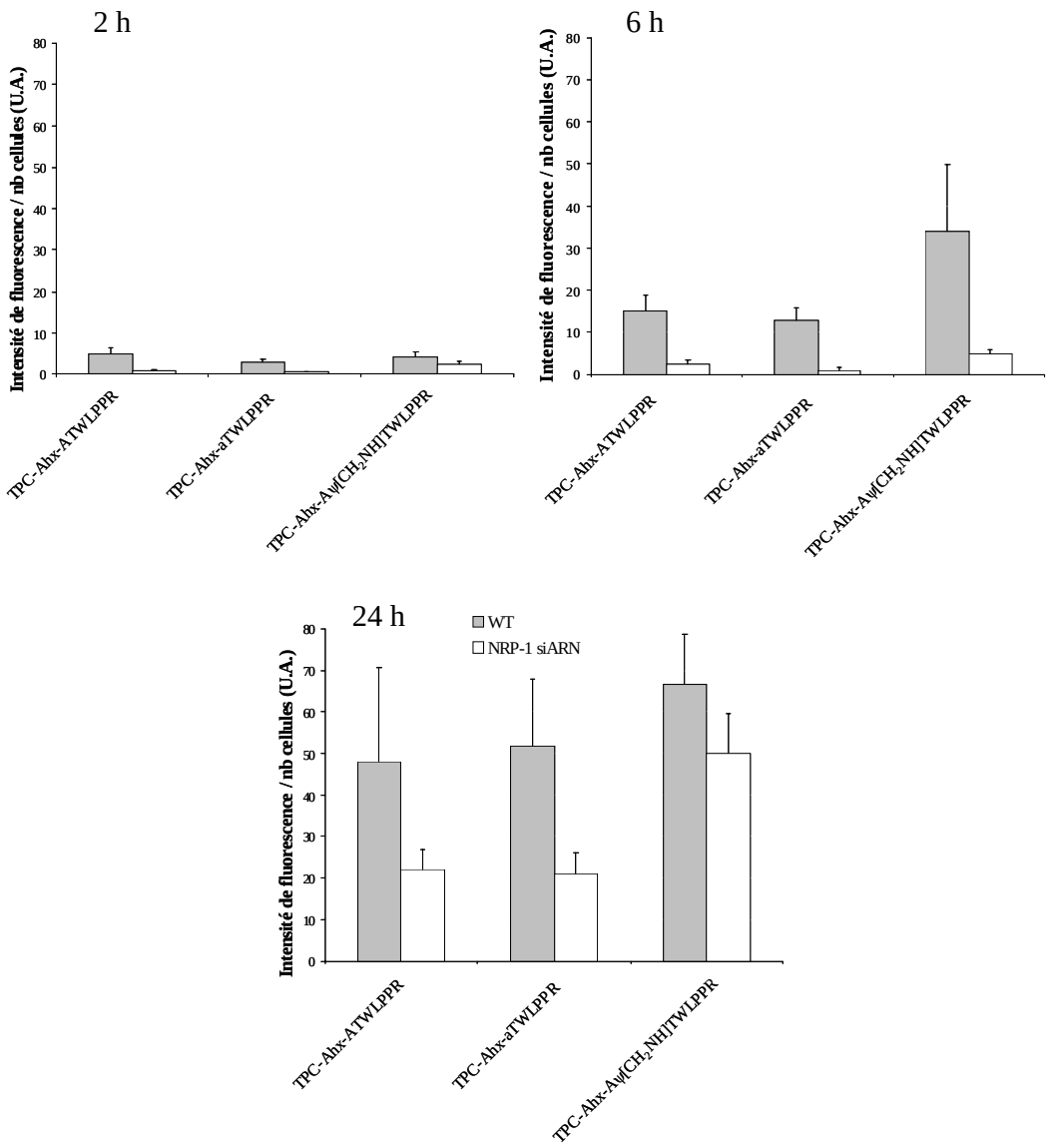


Figure 47 : Incorporation cellulaire après 2, 6 et 24 h de contact, des PSs conjugués pour la lignée sauvage MDA-MB-231 sur-exprimant NRP-1 (WT) ou la lignée *knockdown* exprimant faiblement NRP-1 (NRP-1 siARN).

Les cellules ont été incubées en présence de 5 µM de PS. Les intensités de fluorescence intracellulaire après extraction ont été mesurées à 652 nm après excitation à 415 nm. L'intensité de fluorescence des PSs a été rapportée à la quantité de cellules évaluée par un test MTT. Les données représentent les moyennes ± écart-type, n = 12.

Les taux d'incorporation pour un temps et une lignée donnée sont comparables quel que soit le PS (Figure 47). Il est intéressant de noter que la diminution d'incorporation cellulaire des PSs observée dans la lignée transformée par le plasmide est du même ordre de grandeur que celle du niveau d'expression de NRP-1. Cela valide l'implication de NRP-1 dans l'endocytose récepteur-dépendante des PSs conjugués.

II.6 Stabilité *in vivo* des peptides conjugués

La stabilité *in vivo* des PSs conjugués a été, dans un premier temps, évaluée dans le plasma de souris *nude* à 1 et 4 h après injection par voie intra-veineuse par une analyse en spectrométrie de masse (MALDI TOF). Les résultats sont présentés sur la Figure 48.

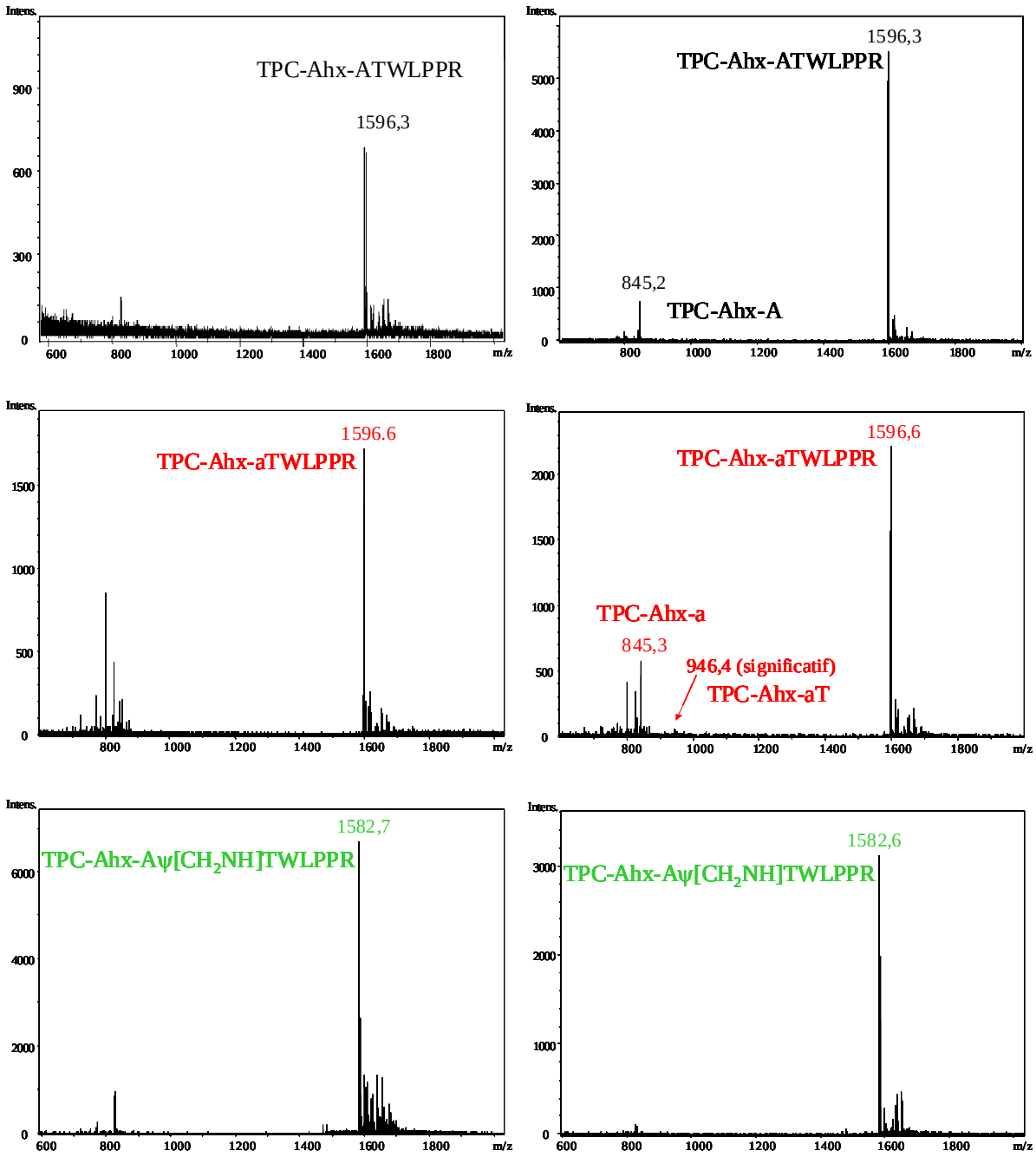


Figure 48 : Spectre de masse des PSs dans le plasma 1 h (à gauche) et 4 h (à droite) après injection par voie intraveineuse (5,6 mg/kg) chez la souris *nude*.

Pour les trois PSs testés, aucune dégradation n'est observée dans le plasma 1 h après injection. Pour la TPC-Ahx-ATWLPPR, 4 h après injection, une dégradation du peptide est identifiée résultant d'une seule coupure entre les résidus d'acides aminés Ala et Thr comme cela a été décrit précédemment (Tirand *et al.*, 2007). Pour la TPC-Ahx-aTWLPPR, deux sites de coupure sont décelés 4 h post-injection. La première, comme pour le peptide non modifié, se situe entre les résidus *D*-Ala et Thr, la deuxième entre Thr et Trp. Beaucoup plus prometteur, le PS conjugué au peptide possédant une liaison réduite entre Ala et Thr, ne présente aucune coupure dans le plasma jusqu'à 4 h après injection. Le composé reste stable, la liaison réduite n'est donc pas attaquée par les peptidases.

Le suivi plasmatique des PSs chez la souris *nude* a été réalisé par HPLC à 1, 2 et 4 h après injection selon la méthode décrite, dans Thomas et *al.*, PPS, 2008 (Figure 49). Les taux plasmatiques de TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR sont en moyenne plus élevés à 2 et 4 h après injection en comparaison aux deux autres PSs. Cette augmentation des concentrations circulantes en PS conjugué au peptide Aψ[CH_2NH]TWLPPR est en accord avec l'absence de dégradation identifiée par spectrométrie de masse.

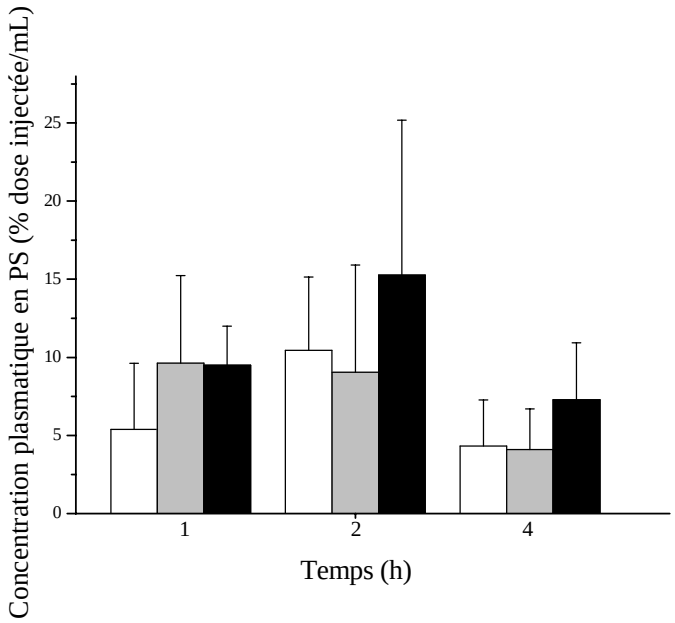


Figure 49 : Concentration plasmatique en fonction du temps après injection de 2,8 mg/kg chez la souris *nude* en TPC-Ahx-ATWLPPR (blanc), -aTWLPPR (gris) et –Aψ[CH_2NH]TWLPPR (noir) en pourcentage de la dose injectée par mL de plasma. Moyenne ± écart-type pour 3 à 6 expérimentations.

Les concentrations en PSs dans le foie ont été également évaluées chez la souris *nude*. Le conjugué TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR présente des concentrations 1,5 fois plus élevées 24 h après injection (0,9% de la dose injectée/g) que le conjugué non modifié (0,6% de la dose injectée/g) alors que la TPC-Ahx-aTWLPPR est 3 fois moins concentrée (0,2% de la dose injectée/g). Les concentrations tumorales additionnées de la TPC-Ahx-ATWLPPR et de son produit de dégradation TPC-Ahx-A ont été comparées à celles de la TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR (Figure 50). Deux heures après injection, la concentration tumorale de la TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR est comparable au cumul de la TPC-Ahx-ATWLPPR et TPC-Ahx-A.

Le pseudopeptide Aψ[CH_2NH]TWLPPR se présente donc comme un bon candidat pour améliorer la stabilité *in vivo* après conjugaison au PS.

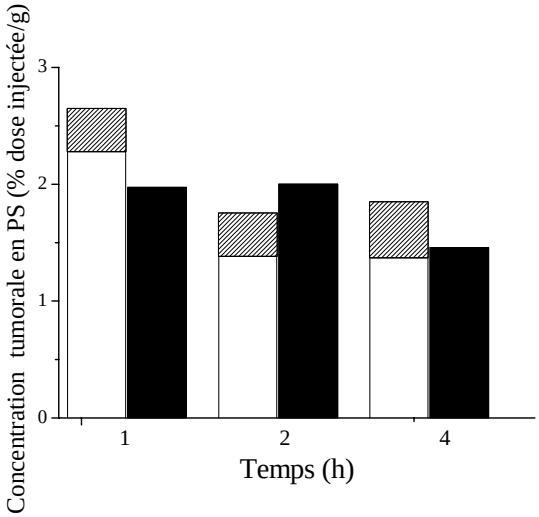


Figure 50 : Concentration tumorale en fonction du temps en TPC-Ahx-ATWLPPR (blanc) et son produit de dégradation TPC-Ahx-A (hachuré) comparé à la TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR (noir) en pourcentage de la dose injectée par g de tumeur après injection de 2,8 mg/kg chez la souris *nude* xénogreffée (U87). n=3 à 6.

III. Conclusion

Les modifications entre les résidus Ala et Thr du peptide ATWLPPR ne sont pas préjudiciables à l'affinité vis-à-vis des NRPs. De plus, le PS conjugué au peptide possèdant une liaison peptidique réduite (Aψ[CH_2NH]TWLPPRR) est stable 4 h après injection. Ce résultat extrêmement prometteur indique qu'en utilisant la TPC-Ahx-Aψ[CH_2NH]TWLPPR nous ne devrions pas avoir d'incorporation non spécifique due à la dégradation de la partie peptidique.

Synthèse générale et perspectives

Chapitre VI : Synthèse générale et perspectives

L'effet anti-vasculaire joue un rôle prédominant dans l'éradication tumorale par PDT. Ainsi, le but de notre stratégie était de le favoriser par ciblage de la néo-vascularisation tumorale dénommé VTP (*Vascular Targeted PDT*). Les cellules endothéliales angiogéniques bordant les vaisseaux sanguins tumoraux expriment des marqueurs moléculaires spécifiques qu'il est possible de cibler. Pour cela, nous avons étudié *in vitro* et *in vivo* un PS de 2ème génération de type chlorine couplé à un heptapeptide (ATWLPPR) spécifique d'un co-récepteur du VEGF, la NRP-1.

La **première partie** de ce travail de thèse a été de réaliser *in vitro* et *in vivo* une étude comparative en termes d'affinité cellulaire et de sélectivité tumorale du PS libre (TPC), *versus* le PS conjugué (TPC-Ahx-ATWLPPR).

Nous avons démontré que la TPC ne présentait aucune affinité vis-à-vis de NRP-1, contrairement à TPC-Ahx-ATWLPPR. *In vitro* l'incorporation du conjugué a été améliorée d'un facteur 10 sur une lignée sur-exprimant NRP-1 (MDA-MB-231). A l'inverse, pour la même lignée partiellement réprimée en expression de NRP-1 par ARN interférence, l'incorporation cellulaire du conjugué est inhibée en moyenne de 50% après 24 h de contact. *In vivo*, le conjugué s'accumule préférentiellement au niveau des cellules endothéliales de la tumeur par comparaison à la TPC. *In vivo*, nous avons également mis en évidence l'action anti-vasculaire de TPC-Ahx-ATWLPPR apportée par le couplage du peptide. En effet, la PDT avec TPC-Ahx-ATWLPPR, et non celle avec TPC, induit des diminutions d'environ 50% du flux sanguin pendant le traitement. L'efficacité photodynamique avec la TPC-Ahx-ATWLPPR a permis d'aboutir à un retard de croissance statistiquement significatif, comparé à la PDT avec TPC. Cette partie est soumise à publication dans « *Journal of Photochemistry and Photobiology B : biology* ».

Les peptides peuvent être dégradés *in vivo* par des peptidases, ce qui supprime fortement la sélectivité du PS conjugué pour les néo-vaisseaux. Dans une **deuxième partie,** nous avons étudié la stabilité *in vitro* et *in vivo* du PS conjugué.

Si la séquence peptidique du PS conjugué est stable dans du plasma *in vitro*, elle est progressivement dégradée *in vivo*, chez la souris, au niveau de la liaison peptidique située entre les résidus alanine et thréonine. Cette dégradation a principalement lieu dans le foie, où le PS conjugué s'accumule à des taux élevés. *In vitro*, nous avons pu mettre en évidence l'implication des peptidases lysosomales. Le PS conjugué est stable dans le milieu de culture des cellules endothéliales, mais dégradé après incorporation intracellulaire. Ceci n'est pas préjudiciable à notre stratégie, puisque le peptide a déjà joué son rôle de molécule ciblante, et que, à ce stade, seule la partie PS est importante pour l'effet phototoxique. Cette partie a été publiée en 2007 dans « *Drug Metabolism and Drug Disposition* ».

Dans une **troisième partie**, nous avons réalisé une étude pharmacocinétique et de biodistribution de la TPC-Ahx-ATWLPPR et de son principal produit de dégradation *in vivo*, TPC-Ahx-A. L'élimination de la TPC-Ahx-ATWLPPR s'est révélée rapide à partir du compartiment sanguin. Le conjugué est présent à des taux élevés dans la tumeur et faible dans la peau. L'accumulation du conjugué est importante dans les organes du système réticulo-endothélial où le processus de dégradation de la partie peptidique est majoritaire. TPC-Ahx-A a été observé dès 2 h dans le plasma. Ce produit de dégradation a perdu toute sélectivité et est moins rapidement éliminé, notamment dans la peau. Ces résultats nous ont permis de choisir un IDL de 4 h pour optimiser les conditions de PDT. En effet, 4 h après injection i.v. chez la souris, nous avons un bon compromis entre les taux dans la tumeur et la faible dégradation du conjugué. Ces travaux ont été publiés en 2008 dans « *Photochemical and Photobiological Sciences* ».

Grâce à ces études, nous avons également pu mettre en place une stratégie d'élaboration de peptides modifiés plus stables vis-à-vis des peptidases tissulaires et plasmatiques.

Ainsi, dans une **quatrième partie,** afin d'éviter toute accumulation du produit de dégradation, nous avons synthétisé et testé de nouveaux peptides et pseudopeptide dans le but d'augmenter leur stabilité *in vivo*. La synthèse, la purification ainsi que les caractéristiques

photochimiques ont été réalisées avec ces nouvelles molécules. Deux peptides dont les modifications n'affectent pas leur affinité vis-à-vis du récepteur NRP-1 ont été retenus pour la validation de sélectivité *in vitro* et la stabilité *in vivo* par comparaison à la TPC-Ahx-ATWLPPR. L'incorporation cellulaire de la TPC couplée aux nouveaux peptides est comparable au conjugué initial. Le pseudopeptide conjugué possédant la liaison réduite entre l'alanine et la thréonine (Aψ[CH_2NH]TWLPPR) est stable dans le plasma 4 h après injection par voie intraveineuse contrairement au peptide aTWLPPR qui présente, tout comme le conjugué ATWLPPR, dès 2 h après injection par voie i.v. une dégradation de la partie peptidique entre l'alanine et la thréonine.

Nous avons démontré que le peptide Aψ[CH_2NH]TWLPPR était stable dans le plasma 4 h après injection par voie i.v. Il faudrait vérifier par HPLC sa stabilité au-delà de 4 h dans le plasma mais également dans la tumeur et le foie. Nous avons utilisé une technique d'ARN interférence pour pouvoir définir plus précisément la part d'incorporation intracellulaire provenant de mécanismes spécifiques par rapport à celle issue de mécanismes non spécifiques. Cependant, la technique n'a pas permis un *silencing* total de l'expression du gène. Il serait préférable d'améliorer le protocole de transfection afin d'obtenir un modèle de lignée cellulaire dont l'expression de NRP-1 serait inhibée d'au moins 60%.

Des améliorations peuvent et doivent être apportées à notre stratégie pour réduire les phénomènes non spécifiques résultant de la diminution d'affinité des peptides pour NRP-1 suite au couplage avec la TPC, du caractère hydrophobe et agrégé du conjugué et d'une capture importante par le système. Une solution pour pallier ces facteurs limitant est d'utiliser des **nanoparticules** multifonctionnelles à caractère « furtif » vecteur du PS et fonctionnalisées par le pseudopeptide. Leur petite taille (5–20 nm) associée à des propriétés physiques originales, font des nanoparticules des outils adaptés en PDT. En effet, fonctionnalisées d'un ligand peptidique, elles pourront cibler NRP-1. De plus, des nanoparticules permettraient de limiter le problème d'agrégation en transportant des molécules de PS greffées dans la matrice. Ce projet est déjà en cours et constitue les sujets de thèse de Denise Bechet et Pierre Couleaud.

D'autres peptides plus affins vis-à-vis du co-récepteur NRP-1 sont actuellement étudiés. Plusieurs stratégies sont envisagées.

Tout d'abord, une méthode de modélisation moléculaire (*docking*) permettra le *design* de peptides sur la base des exons 7 et 8 du VEGF-A (Collaboration Régis Vanderesse, thèse d'Ezatul Ezleen Kamarulzaman). Les peptides sont ensuite synthétisés et sélectionnés par test ELISA avant d'être greffés à un PS pour évaluer leur stabilité *in vivo*. Il sera ensuite possible d'élaborer, à partir des peptides les plus affins, des peptidomimétiques à base de sucres dans le but d'éliminer toute possibilité de dégradation *in vivo* (Collaboration Yves Chapleur, thèse d'Alexandre Novoa).

Une approche non encore envisagée mais néanmoins intéressante serait d'utiliser des Aptamères. En effet, ce sont des oligonucléotides sélectionnés à partir d'une banque aléatoire de séquences selon leurs aptitudes à reconnaître une cible. Ces aptamères présentent des affinités et spécificités comparables à celles des anticorps pour des molécules variées (acides aminés, antibiotiques, motifs ARN ou ADN, protéines) (Chauveau *et al.*, 2006). Un aptamère inhibant la forme humaine de VEGF (Pegaptanib, Macugen®), a déjà été mis sur le marché aux Etat-Unis pour le traitement de la DMLA (Ng *et al.*, 2006). Il serait intéressant d'étudier la possibilité d'élaborer des aptamères spécifiques de la partie extracellulaire des récepteurs au VEGF.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

Abedi H., Zachary I. *Vascular endothelial growth factor stimulates tyrosine phosphorylation and recruitment to new focal adhesions of focal adhesion kinase and paxillin in endothelial cells*. **J Biol Chem**, 1997, 272(24):15442-51.

Abels C. *Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT)*. **Photochem Photobiol Sci**, 2004, 3(8):765-71.

Adessi C., Frossard M.J., Boissard C., Fraga S., Bieler S., Ruckle T., Vilbois F., Robinson S.M., Mutter M., Banks W.A., Soto C. *Pharmacological profiles of peptide drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease*. **J Biol Chem**, 2003, 278(16):13905-11.

Adessi C., Soto C. *Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability*. **Curr Med Chem**, 2002, 9(9):963-78.

Agarwal M.L., Larkin H.E., Zaidi S.I., Mukhtar H., Oleinick N.L. *Phospholipase activation triggers apoptosis in photosensitized mouse lymphoma cells*. **Cancer Res**, 1993, 53(24):5897-902.

Agostinis P., Buytaert E., Breyssens H., Hendrickx N. *Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis*. **Photochem Photobiol Sci**, 2004, 3(8):721-9.

Akhlynina T.V., Jans D.A., Rosenkranz A.A., Statsyuk N.V., Balashova I.Y., Toth G., Pavo I., Rubin A.B., Sobolev A.S. *Nuclear targeting of chlorin e6 enhances its photosensitizing activity*. **J Biol Chem**, 1997, 272(33):20328-31.

Akhlynina T.V., Jans D.A., Statsyuk N.V., Balashova I.Y., Toth G., Pavo I., Rosenkranz A.A., Naroditsky B.S., Sobolev A.S. *Adenoviruses synergize with nuclear localization signals to enhance nuclear delivery and photodynamic action of internalizable conjugates containing chlorin e6*. **Int J Cancer**, 1999, 81(5):734-40.

Akhlynina T.V., Rosenkranz A.A., Jans D.A., Sobolev A.S. *Insulin-mediated intracellular targeting enhances the photodynamic activity of chlorin e6*. **Cancer Res**, 1995, 55(5):1014-9.

al-Obeidi F., Hruby V.J., Sawyer T.K. *Peptide and peptidomimetic libraries. Molecular diversity and drug design*. **Mol Biotechnol**, 1998, 9(3):205-23.

Amessou M., Carrez D., Patin D., Sarr M., Grierson D.S., Croisy A., Tedesco A.C., Maillard P., Johannes L. *Retrograde delivery of photosensitizer (TPPp-O-beta-GluOH)3 selectively potentiates its photodynamic activity*. **Bioconjug Chem**, 2008, 19(2):532-8.

Appleton B.A., Wu P., Maloney J., Yin J., Liang W.C., Stawicki S., Mortara K., Bowman K.K., Elliott J.M., Desmarais W., Bazan J.F., Bagri A., Tessier-Lavigne M., Koch A.W., Wu Y., Watts R.J., Wiesmann C. *Structural studies of neuropilin/antibody complexes provide insights into semaphorin and VEGF binding*. **Embo J**, 2007, 26(23):4902-12.

Atherton E., Law H.D., Moore S., Elliott D.F., Wade R. *Synthesis of peptides containing N-2-aminoethylglycine--'reduction analogues'*. **J Chem Soc** 1971, 20:3393-8.

Augustin H.G. *Antiangiogenic tumour therapy: will it work?* **Trends Pharmacol Sci**, 1998, 19(6):216-22.

Bachelder R.E., Crago A., Chung J., Wendt M.A., Shaw L.M., Robinson G., Mercurio A.M. *Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for neuropilin-expressing breast carcinoma cells*. **Cancer Res**, 2001, 61(15):5736-40.

Bachelder R.E., Lipscomb E.A., Lin X., Wendt M.A., Chadborn N.H., Eickholt B.J., Mercurio A.M. *Competing autocrine pathways involving alternative neuropilin-1 ligands regulate chemotaxis of carcinoma cells*. **Cancer Res**, 2003, 63(17):5230-3.

Bailey M.D., Halmos T., Goudreau N., Lescop E., Llinas-Brunet M. *Novel azapeptide inhibitors of hepatitis C virus serine protease*. **J Med Chem**, 2004, 47(15):3788-99.

Balaram P. *Non-standard amino acids in peptide design and protein engineering*. **Curr Opin Struct Biol**, 1992, 2(6):845-51.

Barleon B., Sozzani S., Zhou D., Weich H.A., Mantovani A., Marme D. *Migration of human monocytes in response to vascular endothelial growth factor (VEGF) is mediated via the VEGF receptor flt-1*. **Blood**, 1996, 87(8):3336-43.

Bechet D., Couleaud P., Frochot C., Viriot M.L., Guillemin F., Barberi-Heyob M. *Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents*. **Trends Biotechnol**, 2008.

Bergers G., Benjamin L.E. *Tumorigenesis and the angiogenic switch*. **Nat Rev Cancer**, 2003, 3(6):401-10.

Bernatchez P.N., Rollin S., Soker S., Sirois M.G. *Relative effects of VEGF-A and VEGF-C on endothelial cell proliferation, migration and PAF synthesis: Role of neuropilin-1*. **J Cell Biochem**, 2002, 85(3):629-39.

Bianchi A., Becuwe P., Franck P., Dauca M. *Induction of MnSOD gene by arachidonic acid is mediated by reactive oxygen species and p38 MAPK signaling pathway in human HepG2 hepatoma cells*. **Free Radic Biol Med**, 2002, 32(11):1132-42.

Bikfalvi A. *Angiogenese tumorale*. **Bul Cancer**, 2006, 93:154-64.

Binetruy-Tournaire R., Demangel C., Malavaud B., Vassy R., Rouyre S., Kraemer M., Plouet J., Derbin C., Perret G., Mazie J.C. *Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis*. **Embo J**, 2000, 19(7):1525-33.

Birchler M., Viti F., Zardi L., Spiess B., Neri D. *Selective targeting and photocoagulation of ocular angiogenesis mediated by a phage-derived human antibody fragment*. **Nat Biotechnol**, 1999, 17(10):984-8.

Birnboim H.C. *A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA*. **Methods Enzymol**, 1983, 100:243-55.

Bisland S.K., Singh D., Gariepy J. *Potentiation of chlorin e6 photodynamic activity in vitro with peptide-based intracellular vehicles*. **Bioconjug Chem**, 1999, 10(6):982-92.

Boisbrun R., Engrand P., Olié P., Hupont S., Regnouf-de-Vains J.-B., Frochot C. *Design and photophysical properties of new RGD targeted tetraphenylchlorins and porphyrins*. **Tetrahedron**, 2008, 64(16):3494-504.

Bonneau S., Morliere P., Brault D. *Dynamics of interactions of photosensitizers with lipoproteins and membrane-models: correlation with cellular incorporation and subcellular distribution*. **Biochem Pharmacol**, 2004, 68(7):1443-52.

Bonneau S., Vever-Bizet C., Mojzisova H., Brault D. *Tetrapyrrole-photosensitizers vectorization and plasma LDL: a physico-chemical approach*. **Int J Pharm**, 2007, 344(1-2):78-87.

Bonneau S., Vever-Bizet C., Morliere P., Maziere J.C., Brault D. *Equilibrium and kinetic studies of the interactions of a porphyrin with low-density lipoproteins*. **Biophys J**, 2002, 83(6):3470-81.

Borle F., Radu A., Fontolliet C., van den Bergh H., Monnier P., Wagnieres G. *Selectivity of the photosensitiser Tookad for photodynamic therapy evaluated in the Syrian golden hamster cheek pouch tumour model*. **Br J Cancer**, 2003, 89(12):2320-6.

Borsi L., Balza E., Carnemolla B., Sassi F., Castellani P., Berndt A., Kosmehl H., Biro A., Siri A., Orecchia P., Grassi J., Neri D., Zardi L. *Selective targeted delivery of TNFalpha to tumor blood vessels*. **Blood**, 2003, 102(13):4384-92.

Boyle R.W., Dolphin D. *Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers*. **Photochem Photobiol**, 1996, 64(3):469-85.

Brown M. *PDT: light at the end of the tunnel?* **Drug Discov. Today**, 2003, 8(17):767-8.

Brown S.B., Brown E.A., Walker I. *The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment*. **Lancet Oncol**, 2004, 5(8):497-508.

Brummelkamp T.R., Bernards R., Agami R. *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells*. **Science**, 2002, 296(5567):550-3.

Cackowski F.C., Xu L., Hu B., Cheng S.Y. *Identification of two novel alternatively spliced Neuropilin-1 isoforms*. **Genomics**, 2004, 84(1):82-94.

Cai H., Reed R.R. *Cloning and characterization of neuropilin-1-interacting protein: a PSD-95/Dlg/ZO-1 domain-containing protein that interacts with the cytoplasmic domain of neuropilin-1*. **J Neurosci**, 1999, 19(15):6519-27.

Carmeliet P. *Angiogenesis in health and disease*. **Nat Med**, 2003, 9(6):653-60.

Carpino L.A., Han G.Y. *The 9-fluorenylmethoxycarbonyl aminoprotecting group*. **J Org Chem**, 1972, 37:3404.

Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. *Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization*. **Photodiagn Photodyn Ther**, 2004, 1(4):279-93.

Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. *Mechanisms in photodynamic therapy: Part three - Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction*. **Photodiagn Photodyn Ther**, 2005a, 2(2):91-106.

Castano A.P., Demidova T.N., Hamblin M.R. *Mechanisms in photodynamic therapy: Part two - Cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death*. **Photodiagn Photodyn Ther**, 2005b, 2(1 SPEC. ISS.):1-23.

Cavanaugh P.G. *Synthesis of chlorin e6-transferrin and demonstration of its light-dependent in vitro breast cancer cell killing ability*. **Breast Cancer Res Treat**, 2002, 72(2):117-30.

Chaleix V., Sol V., Guilloton M., Granet R., Krausz P. *Efficient synthesis of RGD-containing cyclic peptide-porphyrin conjugates by ring-closing metathesis on solid suppport*. **Tetrahedron Lett**, 2004, 45:5295-99.

Chaleix V., Sol V., Huang Y.-M., Guilloton M., Granet R., Blais J.-C., Krausz P. *RGD-Porphyrin Conjugates: Synthesis and Potential Application in Photodynamic Therapy*. **Eur J Org Chem**, 2003, 8:1486-93.

Chatterjee D.K., Fong L.S., Zhang Y. *Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm*. **Adv Drug Deliv Rev**, 2008a.

Chatterjee J., Gilon C., Hoffman A., Kessler H. *N-methylation of peptides: a new perspective in medicinal chemistry*. **Acc Chem Res**, 2008b, 41(10):1331-42.

Chauveau F., Pestourie C., Tavitian B. *[Aptamers: selection and scope of applications]*. **Pathol Biol (Paris)**, 2006, 54(4):251-8.

Chen B., Pogue B.W., Hoopes P.J., Hasan T. *Vascular and cellular targeting for photodynamic therapy*. **Crit Rev Eukaryot Gene Expr**, 2006, 16(4):279-305.

Chen B., Roskams T., de Witte P.A. *Antivascular tumor eradication by hypericin-mediated photodynamic therapy*. **Photochem Photobiol**, 2002a, 76(5):509-13.

Chen B., Roskams T., Xu Y., Agostinis P., de Witte P.A. *Photodynamic therapy with hypericin induces vascular damage and apoptosis in the RIF-1 mouse tumor model*. **Int J Cancer**, 2002b, 98(2):284-90.

Chen H., Chedotal A., He Z., Goodman C.S., Tessier-Lavigne M. *Neuropilin-2, a novel member of the neuropilin family, is a high affinity receptor for the semaphorins Sema E and Sema IV but not Sema III*. **Neuron**, 1997, 19(3):547-59.

Chen J., Jarvi M., Lo P.C., Stefflova K., Wilson B.C., Zheng G. *Using the singlet oxygen scavenging property of carotenoid in photodynamic molecular beacons to minimize photodamage to non-targeted cells*. **Photochem Photobiol Sci**, 2007, 6(12):1311-7.

Chen J., Stefflova K., Niedre M.J., Wilson B.C., Chance B., Glickson J.D., Zheng G. *Protease-triggered photosensitizing beacon based on singlet oxygen quenching and activation*. **J Am Chem Soc**, 2004a, 126(37):11450-1.

Chen Q., Huang Z., Luck D., Beckers J., Brun P.H., Wilson B.C., Scherz A., Salomon Y., Hetzel F.W. *Preclinical studies in normal canine prostate of a novel palladium-bacteriopheophorbide (WST09) photosensitizer for photodynamic therapy of prostate cancers*. **Photochem Photobiol**, 2002c, 76(4):438-45.

Chen X., Hui L., Foster D.A., Drain C.M. *Efficient synthesis and photodynamic activity of porphyrin-saccharide conjugates: targeting and incapacitating cancer cells*. **Biochemistry**, 2004b, 43(34):10918-29.

Chomczynski P., Sacchi N. *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. **Anal Biochem**, 1987, 162(1):156-9.

Chorev M., Goodman M. *A dozen years of retro-inverso peptidomimetics*. **Acc. Chem.Res.**, 1993, (26):266-73.

Christinger H.W., Fuh G., de Vos A.M., Wiesmann C. *The crystal structure of placental growth factor in complex with domain 2 of vascular endothelial growth factor receptor-1*. **J Biol Chem**, 2004, 279(11):10382-8.

Chung N.S., Wasan K.M. *Potential role of the low-density lipoprotein receptor family as mediators of cellular drug uptake*. **Adv Drug Deliv Rev**, 2004, 56(9):1315-34.

Clauss M., Weich H., Breier G., Knies U., Rockl W., Waltenberger J., Risau W. *The vascular endothelial growth factor receptor Flt-1 mediates biological activities. Implications for a functional role of placenta growth factor in monocyte activation and chemotaxis*. **J Biol Chem**, 1996, 271(30):17629-34.

Coy D.H., Heinz-Erian P., Jiang N.Y., Sasaki Y., Taylor J., Moreau J.P., Wolfrey W.T., Gardner J.D., Jensen R.T. *Probing peptide backbone function in bombesin. A reduced peptide bond analogue with potent and specific receptor antagonist activity*. **J Biol Chem**, 1988, 263(11):5056-60.

Cramers P., Ruevekamp M., Oppelaar H., Dalesio O., Baas P., Stewart F.A. *Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy*. **Br J Cancer**, 2003, 88(2):283-90.

Cullen B.R. *Induction of stable RNA interference in mammalian cells*. **Gene Ther**, 2006, 13(6):503-8.

Cullinan-Bove K., Koos R.D. *Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth*. **Endocrinology**, 1993, 133(2):829-37.

Damoiseau X., Schuitmaker H.J., Lagerberg J.W., Hoebeke M. *Increase of the photosensitizing efficiency of the Bacteriochlorin a by liposome-incorporation*. **J Photochem Photobiol B**, 2001, 60(1):50-60.

Dasgupta F., Gangadhar N., Bruhaspathy M., Verma A.K., Sarin S., Mukherjee A.K. *Peptoids as endothelin receptor antagonists*. **Bioorg Med Chem Lett**, 2001, 11(4):555-7.

Davies M.J. *Reactive species formed on proteins exposed to singlet oxygen*. **Photochem Photobiol Sci**, 2004, 3(1):17-25.

de Vree W.J., Essers M.C., Koster J.F., Sluiter W. *Role of interleukin 1 and granulocyte colony-stimulating factor in photofrin-based photodynamic therapy of rat rhabdomyosarcoma tumors*. **Cancer Res**, 1997, 57(13):2555-8.

Delesalle F., Mordon S., Thomas P. *Photothérapie dynamique des angiomes plans* **Nouvelles dermatologiques**, 2008, 27(5):25-6.

DeRosa M.C., Crutchley R.J. *Photosensitized singlet oxygen and its applications*. **Coord Chem Rev**, 2002, 233-234:351-71.

Derycke A.S., de Witte P.A. *Liposomes for photodynamic therapy*. **Adv Drug Deliv Rev**, 2004, 56(1):17-30.

Derycke A.S., Kamuhabwa A., Gijsens A., Roskams T., De Vos D., Kasran A., Huwyler J., Missiaen L., de Witte P.A. *Transferrin-conjugated liposome targeting of photosensitizer AlPcS4 to rat bladder carcinoma cells*. **J Natl Cancer Inst**, 2004, 96(21):1620-30.

Desmettre T., Cohen S.Y., Mordon S. *[Photodynamic therapy and age-related macular degeneration in 2000]*. **J Fr Ophtalmol**, 2001, 24(1):82-93.

Desroches M.C., Bautista-Sanchez A., Lamotte C., Labeque B., Auchere D., Farinotti R., Maillard P., Grierson D.S., Prognon P., Kasselouri A. *Pharmacokinetics of a tri-glucoconjugated 5,10,15-(meta)-trihydroxyphenyl-20-phenyl porphyrin photosensitizer for PDT. A single dose study in the rat*. **J Photochem Photobiol B**, 2006.

Di Stasio B., Frochot C., Dumas D., Even P., Zwier J., Muller A., Didelon J., Guillemin F., Viriot M.L., Barberi-Heyob M. *The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin*. **Eur J Med Chem**, 2005, 40(11):1111-22.

Dixelius J., Makinen T., Wirzenius M., Karkkainen M.J., Wernstedt C., Alitalo K., Claesson-Welsh L. *Ligand-induced vascular endothelial growth factor receptor-3 (VEGFR-3) heterodimerization with VEGFR-2 in primary lymphatic endothelial cells regulates tyrosine phosphorylation sites*. **J Biol Chem**, 2003, 278(42):40973-9.

Djonov V., Baum O., Burri P.H. *Vascular remodeling by intussusceptive angiogenesis*. **Cell Tissue Res**, 2003, 314(1):107-17.

Dorr R.T. *Pharmacology and toxicology of Cremophor EL diluent*. **Ann Pharmacother**, 1994, 28(5 Suppl):S11-4.

Douat C., Heitz A., Paris M., Martinez J., Fehrentz J.A. *Post-synthesis incorporation of a lipidic side chain into a peptide on solid support*. **J Pept Sci**, 2002, 8(11):601-14.

Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korbelik M., Moan J., Peng Q. *Photodynamic therapy*. **J Natl Cancer Inst**, 1998, 90(12):889-905.

Dougherty T.J., Kaufman J.E., Goldfarb A., Weishaupt K.R., Boyle D., Mittleman A. *Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors*. **Cancer Res**, 1978, 38(8):2628-35.

Dougherty T.J., Mang T.S. *Characterization of intra-tumoral porphyrin following injection of hematoporphyrin derivative or its purified component*. **Photochem Photobiol**, 1987, 46(1):67-70.

Dumont D.J., Jussila L., Taipale J., Lymboussaki A., Mustonen T., Pajusola K., Breitman M., Alitalo K. *Cardiovascular failure in mouse embryos deficient in VEGF receptor-3*. **Science**, 1998, 282(5390):946-9.

Eble J.A., Haier J. *Integrins in cancer treatment*. **Current Cancer Drug Targets**, 2006, 6(2):89-105.

Ebos J.M., Bocci G., Man S., Thorpe P.E., Hicklin D.J., Zhou D., Jia X., Kerbel R.S. *A naturally occurring soluble form of vascular endothelial growth factor receptor 2 detected in mouse and human plasma*. **Mol Cancer Res**, 2004, 2(6):315-26.

Eggener S.E., Coleman J.A. *Focal treatment of prostate cancer with vascular-targeted photodynamic therapy*. **Sci World J**, 2008, 8:963-73.

Ellis L.M. *The role of neuropilins in cancer*. **Mol Cancer Ther**, 2006, 5(5):1099-107.

Fayette J., Soria J.C., Armand J.P. *Use of angiogenesis inhibitors in tumour treatment*. **Eur J Cancer**, 2005, 41(8):1109-16.

Ferrara N. *Vascular endothelial growth factor as a target for anticancer therapy*. **Oncologist**, 2004a, 9 Suppl 1:2-10.

Ferrara N. *Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress*. **Endocr Rev**, 2004b, 25(4):581-611.

Ferrara N., Davis-Smyth T. *The biology of vascular endothelial growth factor*. **Endocr Rev**, 1997, 18(1):4-25.

Ferrara N., Gerber H.P. *The role of vascular endothelial growth factor in angiogenesis*. **Acta Haematol**, 2001, 106(4):148-56.

Figge F.H.J., Weiland G.S., Manganiello L.J. *Cancer détection and therapy, affinity of neoplastic, embryonic and traumatized tissues for porphyrins and metalloprophyrins*. **Proc Soc Exp Biol Med**, 1948, 68(640-641).

Fingar V.H., Kik P.K., Haydon P.S., Cerrito P.B., Tseng M., Abang E., Wieman T.J. *Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (BPD)*. **Br J Cancer**, 1999, 79(11-12):1702-8.

Fingar V.H., Siegel K.A., Wieman T.J., Doak K.W. *The effects of thromboxane inhibitors on the microvascular and tumor response to photodynamic therapy*. **Photochem Photobiol**, 1993, 58(3):393-9.

Fingar V.H., Taber S.W., Haydon P.S., Harrison L.T., Kempf S.J., Wieman T.J. *Vascular damage after photodynamic therapy of solid tumors: a view and comparison of effect in pre-clinical and clinical models at the University of Louisville*. **In Vivo**, 2000, 14(1):93-100.

Fingar V.H., Wieman T.J., Wiehle S.A., Cerrito P.B. *The role of microvascular damage in photodynamic therapy: the effect of treatment on vessel constriction, permeability, and leukocyte adhesion*. **Cancer Res**, 1992, 52(18):4914-21.

Folkman J. *What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent?* **J Natl Cancer Inst**, 1990, 82(1):4-6.

Folkman J. *Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease*. **Nat Med**, 1995, 1(1):27-31.

Folkman J. *Angiogenesis and apoptosis*. **Semin Cancer Biol**, 2003, 13(2):159-67.

Foote C.S., Shook F.C., Abakerli R.B. *Characterization of singlet oxygen*. **Methods Enzymol**, 1984, 105:36-47.

Forsythe J.A., Jiang B.H., Iyer N.V., Agani F., Leung S.W., Koos R.D., Semenza G.L. *Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1*. **Mol Cell Biol**, 1996, 16(9):4604-13.

Friedman M. *Chemistry, nutrition, and microbiology of D-amino acids*. **J Agric Food Chem**, 1999, 47(9):3457-79.

Frochot C., Di Stasio B., Barberi-Heyob M., Carre M.C., Zwier J.M., Guillemin F., Viriot M.L. *New glycosylated porphyrins for PDT applications*. **Oftalmologia**, 2003, 56(1):62-6.

Frochot C., Di Stasio B., Vanderesse R., Belgy M.J., Dodeller M., Guillemin F., Viriot M.L., Barberi-Heyob M. *Interest of RGD-containing linear or cyclic peptide targeted tetraphenylchlorin as novel photosensitizers for selective photodynamic activity*. **Bioorg Chem**, 2007, 35(3):205-20.

Fuh G., Li B., Crowley C., Cunningham B., Wells J.A. *Requirements for binding and signaling of the kinase domain receptor for vascular endothelial growth factor*. **J Biol Chem**, 1998, 273(18):11197-204.

Gagnon M.L., Bielenberg D.R., Gechtman Z., Miao H.Q., Takashima S., Soker S., Klagsbrun M. *Identification of a natural soluble neuropilin-1 that binds vascular endothelial growth factor: In vivo expression and antitumor activity*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2000, 97(6):2573-8.

Garbo G.M., Fingar V.H., Wieman T.J., Noakes E.B., 3rd, Haydon P.S., Cerrito P.B., Kessel D.H., Morgan A.R. *In vivo and in vitro photodynamic studies with benzochlorin iminium salts delivered by a lipid emulsion*. **Photochem Photobiol**, 1998, 68(4):561-8.

Gasmi A., Bourcier C., Aloui Z., Srairi N., Marchetti S., Gimond C., Wedge S.R., Hennequin L., Pouyssegur J. *Complete structure of an increasing capillary permeability protein (ICPP) purified from Vipera lebetina venom. ICPP is angiogenic via vascular endothelial growth factor receptor signalling*. **J Biol Chem**, 2002, 277(33):29992-8.

Geretti E., Shimizu A., Klagsbrun M. *Neuropilin structure governs VEGF and semaphorin binding and regulates angiogenesis*. **Angiogenesis**, 2008, 11(1):31-9.

Geretti E., Shimizu A., Kurschat P., Klagsbrun M. *Site-directed mutagenesis in the B-neuropilin-2 domain selectively enhances its affinity to VEGF165, but not to semaphorin 3F*. **J Biol Chem**, 2007, 282(35):25698-707.

Germain R.N. *Accessory cell stimulation of T cell proliferation requires active antigen processing, Ia-restricted antigen presentation, and a separate nonspecific 2nd signal*. **J Immunol**, 1981, 127(5):1964-6.

Giger R.J., Urquhart E.R., Gillespie S.K., Levengood D.V., Ginty D.D., Kolodkin A.L. *Neuropilin-2 is a receptor for semaphorin IV: insight into the structural basis of receptor function and specificity*. **Neuron**, 1998, 21(5):1079-92.

Gilissen M.J., van de Merbel-de Wit L.E., Star W.M., Koster J.F., Sluiter W. *Effect of photodynamic therapy on the endothelium-dependent relaxation of isolated rat aortas*. **Cancer Res**, 1993, 53(11):2548-52.

Gill T.J., 3rd, Gould H.J., Doty P. *Role of optical isomers in determining the antigenicity of synthetic polypeptides*. **Nature**, 1963, 197:746-7.

Gluzman-Poltorak Z., Cohen T., Herzog Y., Neufeld G. *Neuropilin-2 is a receptor for the vascular endothelial growth factor (VEGF) forms VEGF-145 and VEGF-165*. **J Biol Chem**, 2000, 275(38):29922.

Goff B.A., Bamberg M., Hasan T. *Photoimmunotherapy of human ovarian carcinoma cells ex vivo*. **Cancer Res**, 1991, 51(18):4762-7.

Goff B.A., Hermanto U., Rumbaugh J., Blake J., Bamberg M., Hasan T. *Photoimmunotherapy and biodistribution with an OC125-chlorin immunoconjugate in an in vivo murine ovarian cancer model*. **Br J Cancer**, 1994, 70(3):474-80.

Goldberg M.A., Schneider T.J. *Similarities between the oxygen-sensing mechanisms regulating the expression of vascular endothelial growth factor and erythropoietin*. **J Biol Chem**, 1994, 269(6):4355-9.

Gollnick S.O., Evans S.S., Baumann H., Owczarczak B., Maier P., Vaughan L., Wang W.C., Unger E., Henderson B.W. *Role of cytokines in photodynamic therapy-induced local and systemic inflammation*. **Br J Cancer**, 2003, 88(11):1772-9.

Gomer C.J., Ferrario A., Murphree A.L. *The effect of localized porphyrin photodynamic therapy on the induction of tumour metastasis*. **Br J Cancer**, 1987, 56(1):27-32.

Gomes A.J., Lunardi C.N., Tedesco A.C. *Characterization of biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles loaded with bacteriochlorophyll-a for photodynamic therapy*. **Photomed Laser Surg**, 2007, 25(5):428-35.

Gomes A.J., Lunardi L.O., Marchetti J.M., Lunardi C.N., Tedesco A.C. *Photobiological and ultrastructural studies of nanoparticles of poly(lactic-co-glycolic acid)-containing bacteriochlorophyll-a as a photosensitizer useful for PDT treatment*. **Drug Deliv**, 2005, 12(3):159-64.

Gravier J., Schneider R., Frochot C., Bastogne T., Schmitt F., Didelon J., Guillemin F., Barberi-Heyob M. *Improvement of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin-like photosensitizer selectivity with folate-based targeted delivery. synthesis and in vivo delivery studies*. **J Med Chem**, 2008, 51(13):3867-77.

Griffioen A.W., Molema G. *Angiogenesis: potentials for pharmacologic intervention in the treatment of cancer, cardiovascular diseases, and chronic inflammation*. **Pharmacol Rev**, 2000, 52(2):237-68.

Grosskreutz C.L., Anand-Apte B., Duplaa C., Quinn T.P., Terman B.I., Zetter B., D'Amore P.A. *Vascular endothelial growth factor-induced migration of vascular smooth muscle cells in vitro*. **Microvasc Res**, 1999, 58(2):128-36.

Gu C., Limberg B.J., Whitaker G.B., Perman B., Leahy D.J., Rosenbaum J.S., Ginty D.D., Kolodkin A.L. *Characterization of neuropilin-1 structural features that confer binding to semaphorin 3A and vascular endothelial growth factor 165*. **J Biol Chem**, 2002, 277(20):18069-76.

Halliwell B. *Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning)*. **Free Radic Res**, 1999, 31(4):261-72.

Hamblin M.R., Miller J.L., Hasan T. *Effect of charge on the interaction of site-specific photoimmunoconjugates with human ovarian cancer cells*. **Cancer Res**, 1996, 56(22):5205-10.

Hamblin M.R., Newman E.L. *Photosensitizer targeting in photodynamic therapy. I. Conjugates of haematoporphyrin with albumin and transferrin*. **J Photochem Photobiol B**, 1994a, 26(1):45-56.

Hamblin M.R., Newman E.L. *Photosensitizer targeting in photodynamic therapy. II. Conjugates of haematoporphyrin with serum lipoproteins*. **J Photochem Photobiol B**, 1994b, 26(2):147-57.

Hanahan D., Weinberg R.A. *The hallmarks of cancer*. **Cell**, 2000, 100(1):57-70.

Handa B.K., Land A.C., Lord J.A., Morgan B.A., Rance M.J., Smith C.F. *Analogues of beta-LPH61-64 possessing selective agonist activity at mu-opiate receptors*. **Eur J Pharmacol**, 1981, 70(4):531-40.

Hausmann W. *Die sensibilisierende wirkung des hematoporphyrins.*
. **Biochem Z**, 1911, 30:276-316.

He Z., Tessier-Lavigne M. *Neuropilin is a receptor for the axonal chemorepellent Semaphorin III*. **Cell**, 1997, 90(4):739-51.

Herzog Y., Kalcheim C., Kahane N., Reshef R., Neufeld G. *Differential expression of neuropilin-1 and neuropilin-2 in arteries and veins*. **Mech Dev**, 2001, 109(1):115-9.

Hicklin D.J., Ellis L.M. *Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis*. **J Clin Oncol**, 2005, 23(5):1011-27.

Hong Y.K., Lange-Asschenfeldt B., Velasco P., Hirakawa S., Kunstfeld R., Brown L.F., Bohlen P., Senger D.R., Detmar M. *VEGF-A promotes tissue repair-associated lymphatic vessel formation via VEGFR-2 and the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins*. **Faseb J**, 2004, 18(10):1111-3.

Hopkinson H.J., Vernon D.I., Brown S.B. *Identification and partial characterization of an unusual distribution of the photosensitizer meta-tetrahydroxyphenyl chlorin (temoporfin) in human plasma*. **Photochem Photobiol**, 1999, 69(4):482-8.

Huang K., Andersson C., Roomans G.M., Ito N., Claesson-Welsh L. *Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers*. **Int J Biochem Cell Biol**, 2001, 33(4):315-24.

Hudson D., Sharpe R., Szelke M. *Methionine enkephalin and isosteric analogues. Part II.: Receptor conformation of methionine enkephalin*. **Int J Pept Protein Res**, 1980, 15(2):122-9.

Hudson R., Carcenac M., Smith K., Madden L., Clarke O.J., Pelegrin A., Greenman J., Boyle R.W. *The development and characterisation of porphyrin isothiocyanate-monoclonal antibody conjugates for photoimmunotherapy*. **Br J Cancer**, 2005, 92(8):1442-9.

Ichikawa K., Hikita T., Maeda N., Yonezawa S., Takeuchi Y., Asai T., Namba Y., Oku N. *Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long-circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels*. **Biochim Biophys Acta**, 2005, 1669(1):69-74.

Iruela-Arispe M.L., Luque A., Lee N. *Thrombospondin modules and angiogenesis*. **Int J Biochem Cell Biol**, 2004, 36(6):1070-8.

Ishida A., Murray J., Saito Y., Kanthou C., Benzakour O., Shibuya M., Wijelath E.S. *Expression of vascular endothelial growth factor receptors in smooth muscle cells*. **J Cell Physiol**, 2001, 188(3):359-68.

Jain K.K. *Nanotechnology-based drug delivery for cancer*. **Technol Cancer Res Treat**, 2005, 4(4):407-16.

Janecka A., Kruszynski R., Fichna J., Kosson P., Janecki T. *Enzymatic degradation studies of endomorphin-2 and its analogs containing N-methylated amino acids*. **Peptides**, 2006, 27(1):131-5.

Jiang F., Lilge L., Grenier J., Li Y., Wilson M.D., Chopp M. *Photodynamic therapy of U87 human glioma in nude rat using liposome-delivered photofrin*. **Lasers Surg Med**, 1998, 22(2):74-80.

Jiang F.N., Liu D.J., Neyndorff H., Chester M., Jiang S.Y., Levy J.G. *Photodynamic killing of human squamous cell carcinoma cells using a monoclonal antibody-photosensitizer conjugate*. **J Natl Cancer Inst**, 1991, 83(17):1218-25.

Jones M., Leroux J. *Polymeric micelles - a new generation of colloidal drug carriers*. **Eur J Pharm Biopharm**, 1999, 48(2):101-11.

Jori G. *In vivo transport and pharmacokinetic behavior of tumour photosensitizers*. **Ciba Found Symp**, 1989, 146:78-86; discussion -94.

Jori G., Reddi E. *The role of lipoproteins in the delivery of tumour-targeting photosensitizers*. **Int J Biochem**, 1993, 25(10):1369-75.

Jori G., Reddi E., Cozzani I., Tomio L. *Controlled targeting of different subcellular sites by porphyrins in tumour-bearing mice*. **Br J Cancer**, 1986, 53(5):615-21.

Junqueira de Azevedo I.L., Farsky S.H., Oliveira M.L., Ho P.L. *Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the Bothrops insularis pit viper. A new member of the VEGF family of proteins*. **J Biol Chem**, 2001, 276(43):39836-42.

Kaipainen A., Korhonen J., Mustonen T., van Hinsbergh V.W., Fang G.H., Dumont D., Breitman M., Alitalo K. *Expression of the fms-like tyrosine kinase 4 gene becomes restricted to lymphatic endothelium during development*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1995, 92(8):3566-70.

Kanno S., Oda N., Abe M., Terai Y., Ito M., Shitara K., Tabayashi K., Shibuya M., Sato Y. *Roles of two VEGF receptors, Flt-1 and KDR, in the signal transduction of VEGF effects in human vascular endothelial cells*. **Oncogene**, 2000, 19(17):2138-46.

Karpanen T., Heckman C.A., Keskitalo S., Jeltsch M., Ollila H., Neufeld G., Tamagnone L., Alitalo K. *Functional interaction of VEGF-C and VEGF-D with neuropilin receptors*. **Faseb J**, 2006, 20(9):1462-72.

Katoh O., Tauchi H., Kawaishi K., Kimura A., Satow Y. *Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation*. **Cancer Res**, 1995, 55(23):5687-92.

Kawasaki T., Kitsukawa T., Bekku Y., Matsuda Y., Sanbo M., Yagi T., Fujisawa H. *A requirement for neuropilin-1 in embryonic vessel formation*. **Development**, 1999, 126(21):4895-902.

Kessel D. *Table I: Steady-state binding of dyes to plasma Proteins*. In Photosensitizing compunds: their chemistry, biology and clinical use **Ciba Foundation Symp**, (G. Bock and S. Harnett) 1989 pp.90, Wiley, Chichester.

Kessel D. *Pharmacokinetics of N-aspartyl chlorin e6 in cancer patients*. **J Photochem Photobiol B**, 1997, 39(1):81-3.

Kessel D., Thompson P., Saatio K., Nantwi K.D. *Tumor localization and photosensitization by sulfonated derivatives of tetraphenylporphine*. **Photochem Photobiol**, 1987, 45(6):787-90.

Kessel D., Vicente M.G., Reiners J.J., Jr. *Initiation of apoptosis and autophagy by photodynamic therapy*. **Autophagy**, 2006, 2(4):289-90.

Klagsbrun M., Moses M.A. *Molecular angiogenesis*. **Chem Biol**, 1999, 6(8):R217-24.

Knorr R., Trzeciak A., Bannwarth W., Gillessen D. *New coupling reagents in peptide chemistry*. **Tetrahedron Lett**, 1989, 30:1927-30.

Kolodkin A.L., Levengood D.V., Rowe E.G., Tai Y.T., Giger R.J., Ginty D.D. *Neuropilin is a semaphorin III receptor*. **Cell**, 1997, 90(4):753-62.

Komori Y., Nikai T., Taniguchi K., Masuda K., Sugihara H. *Vascular endothelial growth factor VEGF-like heparin-binding protein from the venom of Vipera aspis aspis (Aspic viper)*. **Biochemistry**, 1999, 38(36):11796-803.

Konan Y.N., Chevallier J., Gurny R., Allemann E. *Encapsulation of p-THPP into nanoparticles: cellular uptake, subcellular localization and effect of serum on photodynamic activity*. **Photochem Photobiol**, 2003, 77(6):638-44.

Konan Y.N., Gurny R., Allemann E. *State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy*. **J Photochem Photobiol B**, 2002, 66(2):89-106.

Konerding M.A., Miodonski A.J., Lametschwandtner A. *Microvascular corrosion casting in the study of tumor vascularity: a review*. **Scanning Microsc**, 1995, 9(4):1233-43; discussion 43-4.

Kongshaug M. *Distribution of tetrapyrrole photosensitizers among human plasma proteins*. **Int J Biochem**, 1992, 24(8):1239-65.

Kongshaug M., Moan J., Rimington C., Evensen J. *Binding of PDT photosensitizers to human plasma studied by ultracentrifugation*. In Photodynamic therapy of neoplastic disease
CRC press, (D. Kessel) 1990 pp.43-62, New York.

Koudinova N.V., Pinthus J.H., Brandis A., Brenner O., Bendel P., Ramon J., Eshhar Z., Scherz A., Salomon Y. *Photodynamic therapy with Pd-Bacteriopheophorbide (TOOKAD): successful in vivo treatment of human prostatic small cell carcinoma xenografts*. **Int J Cancer**, 2003, 104(6):782-9.

Krammer B. *Vascular effects of photodynamic therapy*. **Anticancer Res**, 2001, 21(6B):4271-7.

Krosl G., Korbelik M., Dougherty G.J. *Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy*. **Br J Cancer**, 1995, 71(3):549-55.

Kurohane K., Tominaga A., Sato K., North J.R., Namba Y., Oku N. *Photodynamic therapy targeted to tumor-induced angiogenic vessels*. **Cancer Lett**, 2001, 167(1):49-56.

Lassalle H.P., Wagner M., Bezdetnaya L., Guillemin F., Schneckenburger H. *Fluorescence imaging of Foscan and Foslip in the plasma membrane and in whole cells*. **J Photochem Photobiol B**, 2008, 92(1):47-53.

Laville I., Figueiredo T., Loock B., Pigaglio S., Maillard P., Grierson D.S., Carrez D., Croisy A., Blais J. *Synthesis, cellular internalization and photodynamic activity of glucoconjugated derivatives of tri and tetra(meta-hydroxyphenyl)chlorins*. **Bioorg Med Chem**, 2003, 11(8):1643-52.

Laville I., Pigaglio S., Blais J.C., Doz F., Loock B., Maillard P., Grierson D.S., Blais J. *Photodynamic efficiency of diethylene glycol-linked glycoconjugated porphyrins in human retinoblastoma cells*. **J Med Chem**, 2006, 49(8):2558-67.

Le Garrec D., Taillefer J., Van Lier J.E., Lenaerts V., Leroux J.C. *Optimizing pH-responsive polymeric micelles for drug delivery in a cancer photodynamic therapy model*. **J Drug Target**, 2002, 10(5):429-37.

Lee S., Jilani S.M., Nikolova G.V., Carpizo D., Iruela-Arispe M.L. *Processing of VEGF-A by matrix metalloproteinases regulates bioavailability and vascular patterning in tumors*. **J Cell Biol**, 2005, 169(4):681-91.

Leveckis J., Brown N.J., Reed M.W. *The effect of aminolaevulinic acid-induced, protoporphyrin IX-mediated photodynamic therapy on the cremaster muscle microcirculation in vivo*. **Br J Cancer**, 1995, 72(5):1113-9.

Li P., Roller P.P., Xu J. *Current synthetic approaches to peptide and peptidomimetic cyclization*. **Curr Org Chem**, 2002, 6(5):411-40.

Liekens S., De Clercq E., Neyts J. *Angiogenesis: regulators and clinical applications*. **Biochem Pharmacol**, 2001, 61(3):253-70.

Lienhard G.E. *Enzymatic catalysis and transition-state theory*. **Science**, 1973, 180(82):149-54.

Lipson R.L., Baldes E.J. *The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative.* **Arch Dermatol**, 1960, 82(508-516).

Lohela M., Saaristo A., Veikkola T., Alitalo K. *Lymphangiogenic growth factors, receptors and therapies*. **Thromb Haemost**, 2003, 90(2):167-84.

Lombardi A., Nastri F., Pavone V. *Peptide-based heme-protein models*. **Chem Rev**, 2001, 101(10):3165-89.

Lotan R., Raz A. *Lectins in cancer cells*. **Ann N Y Acad Sci**, 1988, 551:385-98.

Low P.S., Henne W.A., Doorneweerd D.D. *Discovery and development of folic-acid-based receptor targeting for imaging and therapy of cancer and inflammatory diseases*. **Acc Chem Res**, 2008, 41(1):120-9.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. **J Biol Chem**, 1951, 193(1):265-75.

Lu Y., Low P.S. *Folate-mediated delivery of macromolecular anticancer therapeutic agents*. **Adv Drug Deliv Rev**, 2002, 54(5):675-93.

Lyttle D.J., Fraser K.M., Fleming S.B., Mercer A.A., Robinson A.J. *Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus*. **J Virol**, 1994, 68(1):84-92.

Maeda H. *The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting*. **Adv Enzyme Regul**, 2001, 41:189-207.

Maeda N., Miyazawa S., Shimizu K., Asai T., Yonezawa S., Kitazawa S., Namba Y., Tsukada H., Oku N. *Enhancement of anticancer activity in antineovascular therapy is based on the intratumoral distribution of the active targeting carrier for anticancer drugs*. **Biol Pharm Bull**, 2006, 29(9):1936-40.

Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Delli-Bovi P., Persico M.G. *Isolation of a human placenta cDNA coding for a protein related to the vascular permeability factor*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1991, 88(20):9267-71.

Maglione D., Guerriero V., Viglietto G., Ferraro M.G., Aprelikova O., Alitalo K., Del Vecchio S., Lei K.J., Chou J.Y., Persico M.G. *Two alternative mRNAs coding for the angiogenic factor, placenta growth factor (PlGF), are transcribed from a single gene of chromosome 14*. **Oncogene**, 1993, 8(4):925-31.

Mamluk R., Gechtman Z., Kutcher M.E., Gasiunas N., Gallagher J., Klagsbrun M. *Neuropilin-1 binds vascular endothelial growth factor 165, placenta growth factor-2, and heparin via its b1b2 domain*. **J Biol Chem**, 2002, 277(27):24818-25.

Mantovani L.T., Miotti S., Menard S., Canevari S., Raspagliesi F., Bottini C., Bottero F., Colnaghi M.I. *Folate binding protein distribution in normal tissues and biological fluids from ovarian carcinoma patients as detected by the monoclonal antibodies MOv18 and MOv19*. **Eur J Cancer**, 1994, 30A(3):363-9.

Martinez J., Bali J.P., Rodriguez M., Castro B., Magous R., Laur J., Lignon M.F. *Synthesis and biological activities of some pseudo-peptide analogues of tetragastrin: The importance of the peptide backbone*. **J Med Chem**, 1985, 28(12):1874-9.

Matsoukas J., Apostolopoulos V., Kalbacher H., Papini A.M., Tselios T., Chatzantoni K., Biagioli T., Lolli F., Deraos S., Papathanassopoulos P., Troganis A., Mantzourani E., Mavromoustakos T., Mouzaki A. *Design and synthesis of a novel potent myelin basic protein epitope 87-99 cyclic analogue: enhanced stability and biological properties of mimics render them a potentially new class of immunomodulators*. **J Med Chem**, 2005, 48(5):1470-80.

Mattot V., Pourtier A., Soncin F., Vandenbunder B. *La morphogenèse de l'arbre vasculaire. De la compréhension des mécanismes moléculaires aux perspectives thérapeutiques*. **Med Sci** 1998, 14(4):437-47.

Maunoury V., Mordon S., Bulois P., Mirabel X., Hecquet B., Mariette C. *Photodynamic therapy for early oesophageal cancer*. **Dig Liver Dis**, 2005, 37(7):491-5.

Mayo G.L., Melendez R.F., Kumar N., McKinnon S.J., Glickman R.D. *Antibody-targeted photodynamic therapy*. **Am J Ophthalmol**, 2003, 136(6):1151-2.

McCarthy J.R., Perez J.M., Bruckner C., Weissleder R. *Polymeric nanoparticle preparation that eradicates tumors*. **Nano letters**, 2005, 5(12):2552-6.

McDonald D.M., Choyke P.L. *Imaging of angiogenesis: from microscope to clinic*. **Nat Med**, 2003, 9(6):713-25.

McMahon G. *VEGF receptor signaling in tumor angiogenesis*. **Oncologist**, 2000, 5 Suppl 1:3-10.

McMahon K.S., Wieman T.J., Moore P.H., Fingar V.H. *Effects of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 on vessel constriction, vessel leakage, and tumor response*. **Cancer Res**, 1994, 54(20):5374-9.

Medina R.A., Owen G.I. *Glucose transporters: expression, regulation and cancer*. **Biol Res**, 2002, 35(1):9-26.

Merrifield R.B. *Solid phase peptide synthesis*. **J Am Chem Soc**, 1963, 85:2149-54.

Mew D., Lum V., Wat C.K., Towers G.H., Sun C.H., Walter R.J., Wright W., Berns M.W., Levy J.G. *Ability of specific monoclonal antibodies and conventional antisera conjugated to hematoporphyrin to label and kill selected cell lines subsequent to light activation*. **Cancer Res**, 1985, 45(9):4380-6.

Mew D., Wat C.K., Towers G.H., Levy J.G. *Photoimmunotherapy: treatment of animal tumors with tumor-specific monoclonal antibody-hematoporphyrin conjugates*. **J Immunol**, 1983, 130(3):1473-7.

Momenteau M., Maillard P., De Belinay M.A., Carrez D., Croisy A. *Tetrapyrrolic glycosylated macrocycles for an application in PDT*. **J Biomed Opt**, 1999, 4(3):298-318.

Moore G.J. *Designing peptide mimetics*. **Trends Pharmacol Sci**, 1994, 15(4):124-9.

Mordon S. *Vascular-targeted photodynamic therapy: a new technique for port wine stain treatment*. **Ann Dermatol Venereol**, 2007, 134(3 Pt 1):281-6.

Morgan A.R., Garbo G.M., Keck R.W., Selman S.H. *New photosensitizers for photodynamic therapy: combined effect of metallopurpurin derivatives and light on transplantable bladder tumors*. **Cancer Res**, 1988, 48(1):194-8.

Mueller M.D., Vigne J.L., Minchenko A., Lebovic D.I., Leitman D.C., Taylor R.N. *Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors alpha and beta*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2000, 97(20):10972-7.

Mueller M.D., Vigne J.L., Pritts E.A., Chao V., Dreher E., Taylor R.N. *Progestins activate vascular endothelial growth factor gene transcription in endometrial adenocarcinoma cells*. **Fertil Steril**, 2003, 79(2):386-92.

Murga M., Fernandez-Capetillo O., Tosato G. *Neuropilin-1 regulates attachment in human endothelial cells independently of vascular endothelial growth factor receptor-2*. **Blood**, 2005, 105(5):1992-9.

Nagy J.A., Vasile E., Feng D., Sundberg C., Brown L.F., Detmar M.J., Lawitts J.A., Benjamin L., Tan X., Manseau E.J., Dvorak A.M., Dvorak H.F. *Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor induces lymphangiogenesis as well as angiogenesis*. **J Exp Med**, 2002, 196(11):1497-506.

Nakamura F., Goshima Y. *Structural and functional relation of neuropilins*. **Adv Exp Med Biol**, 2002, 515:55-69.

Nakamura F., Tanaka M., Takahashi T., Kalb R.G., Strittmatter S.M. *Neuropilin-1 extracellular domains mediate semaphorin D/III-induced growth cone collapse*. **Neuron**, 1998, 21(5):1093-100.

Neagoe P.E., Lemieux C., Sirois M.G. *Vascular endothelial growth factor (VEGF)-A165-induced prostacyclin synthesis requires the activation of VEGF receptor -1 and -2 heterodimer*. **J Biol Chem**, 2005.

Neufeld G., Kessler O., Herzog Y. *The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF*. **Adv Exp Med Biol**, 2002, 515:81-90.

Ng E.W., Shima D.T., Calias P., Cunningham E.T., Jr., Guyer D.R., Adamis A.P. *Pegaptanib, a targeted anti-VEGF aptamer for ocular vascular disease*. **Nat Rev Drug Discov**, 2006, 5(2):123-32.

Okada F., Rak J.W., Croix B.S., Lieubeau B., Kaya M., Roncari L., Shirasawa S., Sasazuki T., Kerbel R.S. *Impact of oncogenes in tumor angiogenesis: mutant K-ras up-regulation of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is necessary, but not sufficient for tumorigenicity of human colorectal carcinoma cells*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1998, 95(7):3609-14.

Olofsson B., Jeltsch M., Eriksson U., Alitalo K. *Current biology of VEGF-B and VEGF-C*. **Curr Opin Biotechnol**, 1999, 10(6):528-35.

Oseroff A.R., Ohuoha D., Hasan T., Bommer J.C., Yarmush M.L. *Antibody-targeted photolysis: selective photodestruction of human T-cell leukemia cells using monoclonal antibody-chlorin e6 conjugates*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1986, 83(22):8744-8.

Pakkala M., Hekim C., Soininen P., Leinonen J., Koistinen H., Weisell J., Stenman U.H., Vepsalainen J., Narvanen A. *Activity and stability of human kallikrein-2-specific linear and cyclic peptide inhibitors*. **J Pept Sci**, 2007, 13(5):348-53.

Pan Q., Chathery Y., Wu Y., Rathore N., Tong R.K., Peale F., Bagri A., Tessier-Lavigne M., Koch A.W., Watts R.J. *Neuropilin-1 binds to VEGF121 and regulates endothelial cell migration and sprouting*. **J Biol Chem**, 2007, 282(33):24049-56.

Parikh A.A., Fan F., Liu W.B., Ahmad S.A., Stoeltzing O., Reinmuth N., Bielenberg D., Bucana C.D., Klagsbrun M., Ellis L.M. *Neuropilin-1 in human colon cancer: expression, regulation, and role in induction of angiogenesis*. **Am J Pathol**, 2004, 164(6):2139-51.

Permanne B., Adessi C., Saborio G.P., Fraga S., Frossard M.J., Van Dorpe J., Dewachter I., Banks W.A., Van Leuven F., Soto C. *Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a beta-sheet breaker peptide*. **Faseb J**, 2002, 16(8):860-2.

Perollet C., Han Z.C., Savona C., Caen J.P., Bikfalvi A. *Platelet factor 4 modulates fibroblast growth factor 2 (FGF-2) activity and inhibits FGF-2 dimerization*. **Blood**, 1998, 91(9):3289-99.

Perret G.Y., Starzec A., Hauet N., Vergote J., Le Pecheur M., Vassy R., Leger G., Verbeke K.A., Bormans G., Nicolas P., Verbruggen A.M., Moretti J.L. *In vitro evaluation and biodistribution of a 99mTc-labeled anti-VEGF peptide targeting neuropilin-1*. **Nucl Med Biol**, 2004, 31(5):575-81.

Piette J., Volanti C., Vantieghem A., Matroule J.Y., Habraken Y., Agostinis P. *Cell death and growth arrest in response to photodynamic therapy with membrane-bound photosensitizers*. **Biochem Pharmacol**, 2003, 66(8):1651-9.

Pinel S., Barberi-Heyob M., Cohen-Jonathan E., Merlin J.L., Delmas C., Plenat F., Chastagner P. *Erythropoietin-induced reduction of hypoxia before and during fractionated irradiation contributes to improvement of radioresponse in human glioma xenografts*. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, 2004, 59(1):250-9.

Policard A. *Etude sur les aspects offerts par des tumeurs expérimentales examinées à la lumière de Wood.* **C R Soc Biol** 1924, 91:1423-4.

Ponka P., Lok C.N. *The transferrin receptor: role in health and disease*. **Int J Biochem Cell Biol**, 1999, 31(10):1111-37.

Prahst C., Heroult M., Lanahan A.A., Uziel N., Kessler O., Shraga-Heled N., Simons M., Neufeld G., Augustin H.G. *Neuropilin-1/VEGFR-2 complexing requires the PDZ-binding domain of neuropilin-1*. **J Biol Chem**, 2008.

Raab O. *Uber die wirkung fluorescierender stoffe auf infusoria*. **Z Biol**, 1900, 39:524-30.

Rawlings N.D., Barrett A.J. *Evolutionary families of peptidases*. **Biochem J**, 1993, 290(1):205-18.

Reddi E., Zhou C., Biolo R., Menegaldo E., Jori G. *Liposome- or LDL-administered Zn (II)-phthalocyanine as a photodynamic agent for tumours. I. Pharmacokinetic properties and phototherapeutic efficiency*. **Br J Cancer**, 1990, 61(3):407-11.

Renno R.Z., Terada Y., Haddadin M.J., Michaud N.A., Gragoudas E.S., Miller J.W. *Selective photodynamic therapy by targeted verteporfin delivery to experimental choroidal neovascularization mediated by a homing peptide to vascular endothelial growth factor receptor-2*. **Arch Ophthalmol**, 2004, 122(7):1002-11.

Renzi M.J., Feiner L., Koppel A.M., Raper J.A. *A dominant negative receptor for specific secreted semaphorins is generated by deleting an extracellular domain from neuropilin-1*. **J Neurosci**, 1999, 19(18):7870-80.

Richter A.M., Waterfield E., Jain A.K., Canaan A.J., Allison B.A., Levy J.G. *Liposomal delivery of a photosensitizer, benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD), to tumor tissue in a mouse tumor model*. **Photochem Photobiol**, 1993, 57(6):1000-6.

Risau W. *Mechanisms of angiogenesis*. **Nature**, 1997, 386(6626):671-4.

Robinson B.S., Riccardi K.A., Gong Y.F., Guo Q., Stock D.A., Blair W.S., Terry B.J., Deminie C.A., Djang F., Colonno R.J., Lin P.F. *BMS-232632, a highly potent human immunodeficiency virus protease inhibitor that can be used in combination with other available antiretroviral agents*. **Antimicrob Agents Chemother**, 2000, 44(8):2093-9.

Rollin S., Lemieux C., Maliba R., Favier J., Villeneuve L.R., Allen B.G., Soker S., Bazan N.G., Merhi Y., Sirois M.G. *VEGF-mediated endothelial P-selectin translocation: role of VEGF receptors and endogenous PAF synthesis*. **Blood**, 2004, 103(10):3789-97.

Rosenkranz A.A., Jans D.A., Sobolev A.S. *Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency*. **Immunol Cell Biol**, 2000, 78(4):452-64.

Rosenkranz A.A., Lunin V.G., Gulak P.V., Sergienko O.V., Shumiantseva M.A., Voronina O.L., Gilyazova D.G., John A.P., Kofner A.A., Mironov A.F., Jans D.A., Sobolev A.S. *Recombinant modular transporters for cell-specific nuclear delivery of locally acting drugs enhance photosensitizer activity*. **Faseb J**, 2003, 17(9):1121-3.

Rossignol M., Gagnon M.L., Klagsbrun M. *Genomic organization of human neuropilin-1 and neuropilin-2 genes: identification and distribution of splice variants and soluble isoforms*. **Genomics**, 2000, 70(2):211-22.

Roth L., Nasarre C., Dirrig-Grosch S., Aunis D., Cremel G., Hubert P., Bagnard D. *Transmembrane domain interactions control biological functions of neuropilin-1*. **Mol Biol Cell**, 2008, 19(2):646-54.

Roy I., Ohulchanskyy T.Y., Pudavar H.E., Bergey E.J., Oseroff A.R., Morgan J., Dougherty T.J., Prasad P.N. *Ceramic-Based Nanoparticles Entrapping Water-Insoluble Photosensitizing Anticancer Drugs: A Novel Drug-Carrier System for Photodynamic Therapy.* **J Am Chem Soc**, 2003, 125:7860-5.

Rozycki J., Rolka K., Wieczorek Z., Zimecki M., Kupryszewski G. *New cyclosporin A analogue: synthesis and immunosuppressive activity*. **Mol Immunol**, 1992, 29(9):1043-7.

Santimaria M., Moscatelli G., Viale G.L., Giovannoni L., Neri G., Viti F., Leprini A., Borsi L., Castellani P., Zardi L., Neri D., Riva P. *Immunoscintigraphic detection of the ED-B domain of fibronectin, a marker of angiogenesis, in patients with cancer*. **Clin Cancer Res**, 2003, 9(2):571-9.

Sasaki Y., Murphy W.A., Heiman M.L., Lance V.A., Coy D.H. *Solid-phase synthesis and biological properties of psi [CH2NH] pseudopeptide analogues of a highly potent somatostatin octapeptide*. **J Med Chem**, 1987, 30(7):1162-6.

Savellano M.D., Hasan T. *Targeting cells that overexpress the epidermal growth factor receptor with polyethylene glycolated BPD verteporfin photosensitizer immunoconjugates*. **Photochem Photobiol**, 2003, 77(4):431-9.

Savellano M.D., Pogue B.W., Hoopes P.J., Vitetta E.S., Paulsen K.D. *Multiepitope HER2 targeting enhances photoimmunotherapy of HER2-overexpressing cancer cells with pyropheophorbide-a immunoconjugates*. **Cancer Res**, 2005, 65(14):6371-9.

Sawano A., Iwai S., Sakurai Y., Ito M., Shitara K., Nakahata T., Shibuya M. *Flt-1, vascular endothelial growth factor receptor 1, is a novel cell surface marker for the lineage of monocyte-macrophages in humans*. **Blood**, 2001, 97(3):785-91.

Sawano A., Takahashi T., Yamaguchi S., Aonuma M., Shibuya M. *Flt-1 but not KDR/Flk-1 tyrosine kinase is a receptor for placenta growth factor, which is related to vascular endothelial growth factor*. **Cell Growth Differ**, 1996, 7(2):213-21.

Schmidt-Erfurth U., Diddens H., Birngruber R., Hasan T. *Photodynamic targeting of human retinoblastoma cells using covalent low-density lipoprotein conjugates*. **Br J Cancer**, 1997, 75(1):54-61.

Schmidt-Erfurth U., Hasan T. *Mechanisms of action of photodynamic therapy with verteporfin for the treatment of age-related macular degeneration*. **Surv Ophthalmol**, 2000, 45(3):195-214.

Schmidt-Erfurth U.M., Pruente C. *Management of neovascular age-related macular degeneration*. **Prog Retin Eye Res**, 2007, 26(4):437-51.

Schneider R., Schmitt F., Frochot C., Fort Y., Lourette N., Guillemin F., Muller J.F., Barberi-Heyob M. *Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy*. **Bioorg Med Chem**, 2005, 13(8):2799-808.

Schneider R., Tirand L., Frochot C., Vanderesse R., Thomas N., Gravier J., Guillemin F., Barberi-Heyob M. *Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy*. **Anticancer Agents Med Chem**, 2006, 6(5):469-88.

Schreiber S., Gross S., Brandis A., Harmelin A., Rosenbach-Belkin V., Scherz A., Salomon Y. *Local photodynamic therapy (PDT) of rat C6 glioma xenografts with Pd-bacteriopheophorbide leads to decreased metastases and increase of animal cure compared with surgery*. **Int J Cancer**, 2002, 99(2):279-85.

Schumacher T.N., Mayr L.M., Minor D.L., Jr., Milhollen M.A., Burgess M.W., Kim P.S. *Identification of D-peptide ligands through mirror-image phage display*. **Science**, 1996, 271(5257):1854-7.

Schwartz S., Absolon K., Vermund H. *Some relationships of porphyrins, x-rays and tumors.* **Med Bull**, 1955, 68:7-13.

Schwarzenbach H., Chakrabarti G., Paust H.J., Mukhopadhyay A.K. *Gonadotropin-mediated regulation of the murine VEGF expression in MA-10 Leydig cells.* **J Androl**, 2004, 25(1):128-39.

Scoazec J. *[Tumor angiogenesis]*. **Ann Pathol**, 2000, 20(1):25-37.

Semenza G. *Signal transduction to hypoxia-inducible factor 1*. **Biochem Pharmacol**, 2002, 64(5-6):993-8.

Shalaby F., Rossant J., Yamaguchi T.P., Gertsenstein M., Wu X.F., Breitman M.L., Schuh A.C. *Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice*. **Nature**, 1995, 376(6535):62-6.

Sharman W.M., van Lier J.E., Allen C.M. *Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems*. **Adv Drug Deliv Rev**, 2004, 56(1):53-76.

Shifren J.L., Mesiano S., Taylor R.N., Ferrara N., Jaffe R.B. *Corticotropin regulates vascular endothelial growth factor expression in human fetal adrenal cortical cells*. **J Clin Endocrinol Metab**, 1998, 83(4):1342-7.

Shima D.T., Deutsch U., D'Amore P.A. *Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability*. **FEBS Lett**, 1995, 370(3):203-8.

Shraga-Heled N., Kessler O., Prahst C., Kroll J., Augustin H., Neufeld G. *Neuropilin-1 and neuropilin-2 enhance VEGF121 stimulated signal transduction by the VEGFR-2 receptor*. **Faseb J**, 2007, 21(3):915-26.

Shweiki D., Itin A., Soffer D., Keshet E. *Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis*. **Nature**, 1992, 359(6398):843-5.

Simon R.J., Kania R.S., Zuckermann R.N., Huebner V.D., Jewell D.A., Banville S., Ng S., Wang L., Rosenberg S., Marlowe C.K., et al. *Peptoids: a modular approach to drug discovery*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 1992, 89(20):9367-71.

Sobolev A.S., Jans D.A., Rosenkranz A.A. *Targeted intracellular delivery of photosensitizers*. **Prog Biophys Mol Biol**, 2000, 73(1):51-90.

Soh E.Y., Sobhi S.A., Wong M.G., Meng Y.G., Siperstein A.E., Clark O.H., Duh Q.Y. *Thyroid-stimulating hormone promotes the secretion of vascular endothelial growth factor in thyroid cancer cell lines*. **Surgery**, 1996, 120(6):944-7.

Soker S., Fidder H., Neufeld G., Klagsbrun M. *Characterization of novel vascular endothelial growth factor (VEGF) receptors on tumor cells that bind VEGF165 via its exon 7-encoded domain*. **J Biol Chem**, 1996, 271(10):5761-7.

Soker S., Gollamudi-Payne S., Fidder H., Charmahelli H., Klagsbrun M. *Inhibition of vascular endothelial growth factor (VEGF)-induced endothelial cell proliferation by a peptide corresponding to the exon 7-encoded domain of VEGF165*. **J Biol Chem**, 1997, 272(50):31582-8.

Soker S., Miao H.Q., Nomi M., Takashima S., Klagsbrun M. *VEGF165 mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance VEGF165-receptor binding*. **J Cell Biochem**, 2002, 85(2):357-68.

Soker S., Takashima S., Miao H.Q., Neufeld G., Klagsbrun M. *Neuropilin-1 Is Expressed by Endothelial and Tumor Cells as an Isoform-Specific Receptor for Vascular Endothelial Growth Factor*. **Cell**, 1998, 92(6):735-45.

Sol V., Chaleix V., Champavier Y., Granet R., Huang Y.M., Krausz P. *Glycosyl bis-porphyrin conjugates: synthesis and potential application in PDT*. **Bioorg Med Chem**, 2006, 14(23):7745-60.

Sol V., Chaleix V., Granet R., Krausz P. *An efficient route to dimeric porphyrin-RGD peptide conjugates via olefin metathesis*. **Tetrahedron**, 2008, 64(2):364-71.

Soukos N.S., Hamblin M.R., Keel S., Fabian R.L., Deutsch T.F., Hasan T. *Epidermal growth factor receptor-targeted immunophotodiagnosis and photoimmunotherapy of oral precancer in vivo*. **Cancer Res**, 2001, 61(11):4490-6.

Spatola A.F. *Chemistry and biochemistry of amino acids, peptides and proteins*. Weinstein Ed.,**Marcel Dekker**, New York, 1983, 7: 267-357.

Starzec A., Ladam P., Vassy R., Badache S., Bouchemal N., Navaza A., du Penhoat C.H., Perret G.Y. *Structure-function analysis of the antiangiogenic ATWLPPR peptide inhibiting VEGF(165) binding to neuropilin-1 and molecular dynamics simulations of the ATWLPPR/neuropilin-1 complex*. **Peptides**, 2007.

Starzec A., Vassy R., Martin A., Lecouvey M., Di Benedetto M., Crepin M., Perret G.Y. *Antiangiogenic and antitumor activities of peptide inhibiting the vascular endothelial growth factor binding to neuropilin-1*. **Life Sci**, 2006, 79(25):2370-81.

Stefflova K., Chen J., Marotta D., Li H., Zheng G. *Photodynamic therapy agent with a built-in apoptosis sensor for evaluating its own therapeutic outcome in situ*. **J Med Chem**, 2006, 49(13):3850-6.

Stephenson J.M., Banerjee S., Saxena N.K., Cherian R., Banerjee S.K. *Neuropilin-1 is differentially expressed in myoepithelial cells and vascular smooth muscle cells in preneoplastic and neoplastic human breast: a possible marker for the progression of breast cancer*. **Int J Cancer**, 2002, 101(5):409-14.

Szala S. *Two-domain vascular disruptive agents in cancer therapy*. **Curr Cancer Drug Targets**, 2004, 4(6):501-9.

Szelke M., Leckie B.J., Tree M., Brown A., Grant J., Hallett A., Hughes M., Jones D.M., Lever A.F. *H-77: a potent new renin inhibitor. In vitro and in vivo studies*. **Hypertension**, 1982, 4(3 Pt 2):59-69.

Takagi S., Hirata T., Agata K., Mochii M., Eguchi G., Fujisawa H. *The A5 antigen, a candidate for the neuronal recognition molecule, has homologies to complement components and coagulation factors*. **Neuron**, 1991, 7(2):295-307.

Takahashi H., Hattori S., Iwamatsu A., Takizawa H., Shibuya M. *A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1*. **J Biol Chem**, 2004, 279(44):46304-14.

Tammela T., Enholm B., Alitalo K., Paavonen K. *The biology of vascular endothelial growth factors*. **Cardiovasc Res**, 2005, 65(3):550-63.

Tang W., Xu H., Kopelman R., Philbert M.A. *Photodynamic characterization and in vitro application of methylene blue-containing nanoparticle platforms*. **Photochem Photobiol**, 2005, 81(2):242-9.

Taylor E.M., Otero D.A., Banks W.A., O'Brien J.S. *Retro-inverso prosaptide peptides retain bioactivity, are stable In vivo, and are blood-brain barrier permeable*. **J Pharmacol Exp Ther**, 2000, 295(1):190-4.

Thomas N., Tirand L., Chatelut E., Plenat F., Frochot C., Dodeller M., Guillemin F., Barberi-Heyob M. *Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice*. **Photochem Photobiol Sci**, 2008, 7(4):433-41.

Tirand L., Frochot C., Vanderesse R., Thomas N., Trinquet E., Pinel S., Viriot M.L., Guillemin F., Barberi-Heyob M. *A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells*. **J Control Release**, 2006, 111(1-2):153-64.

Tirand L., Thomas N., Dodeller M., Dumas D., Frochot C., Maunit B., Guillemin F., Barberi-Heyob M. *Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: an in vivo and in vitro study*. **Drug Metab Dispos**, 2007, 35(5):806-13.

Toi M., Matsumoto T., Bando H. *Vascular endothelial growth factor: its prognostic, predictive, and therapeutic implications*. **Lancet Oncol**, 2001, 2(11):667-73.

Tokunaga Y., Yamazaki Y., Morita T. *Localization of heparin- and neuropilin-1-recognition sites of viral VEGFs*. **Biochem Biophys Res Commun**, 2006, 348(3):957-62.

Trabocchi A., Scarpi D., Guarna A. *Structural diversity of bicyclic amino acids*. **Amino Acids**, 2008, 34(1):1-24.

Tremblay A., Leroy S., Freitag L., Copin M.C., Brun P.H., Marquette C.H. *Endobronchial phototoxicity of WST 09 (Tookad), a new fast-acting photosensitizer for photodynamic therapy: preclinical study in the pig*. **Photochem Photobiol**, 2003, 78(2):124-30.

Triesscheijn M., Ruevekamp M., Aalders M., Baas P., Stewart F.A. *Outcome of mTHPC mediated photodynamic therapy is primarily determined by the vascular response*. **Photochem Photobiol**, 2005, 81(5):1161-7.

Tselios T., Probert L., Daliani I., Matsoukas E., Troganis A., Gerothanassis I.P., Mavromoustakos T., Moore G.J., Matsoukas J.M. *Design and synthesis of a potent cyclic analogue of the myelin basic protein epitope MBP72-85: importance of the Ala81 carboxyl group and of a cyclic conformation for induction of experimental allergic encephalomyelitis*. **J Med Chem**, 1999, 42(7):1170-7.

Vander Kooi C.W., Jusino M.A., Perman B., Neau D.B., Bellamy H.D., Leahy D.J. *Structural basis for ligand and heparin binding to neuropilin B domains*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2007, 104(15):6152-7.

Veenhuizen R., Oppelaar H., Ruevekamp M., Schellens J., Dalesio O., Stewart F. *Does tumour uptake of Foscan determine PDT efficacy?* **Int J Cancer**, 1997a, 73(2):236-9.

Veenhuizen R.B., Ruevekamp M.C., Oppelaar H., Helmerhorst T.J., Kenemans P., Stewart F.A. *Foscan-mediated photodynamic therapy for a peritoneal-cancer model: drug distribution and efficacy studies*. **Int J Cancer**, 1997b, 73(2):230-5.

Vemuri S., Rhodes C.T. *Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review*. **Pharm Acta Helv**, 1995, 70(2):95-111.

Verhelst S.H., Witte M.D., Arastu-Kapur S., Fonovic M., Bogyo M. *Novel aza peptide inhibitors and active-site probes of papain-family cysteine proteases*. **Chembiochem**, 2006, 7(6):943-50.

von Tappeiner H. *Zur Kenntnis der lichtwirkenden (fluoreszierenden) stoffe*. **Dtsch Med Wochenschr**, 1904, 8:265-9.

Vrouenraets M.B., Visser G.W., Stewart F.A., Stigter M., Oppelaar H., Postmus P.E., Snow G.B., van Dongen G.A. *Development of meta-tetrahydroxyphenylchlorin-monoclonal antibody conjugates for photoimmunotherapy*. **Cancer Res**, 1999, 59(7):1505-13.

Wang L., Zeng H., Wang P., Soker S., Mukhopadhyay D. *Neuropilin-1-mediated vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor-dependent endothelial cell migration*. **J Biol Chem**, 2003, 278(49):48848-60.

Wang S., Gao R., Zhou F., Selke M. *Nanomaterials and singlet oxygen photosensitizers: potential applications in photodynamic therapy*. **J Mater Chem**, 2004, 14:487-93.

Wasan K.M., Brocks D.R., Lee S.D., Sachs-Barrable K., Thornton S.J. *Impact of lipoproteins on the biological activity and disposition of hydrophobic drugs: implications for drug discovery*. **Nat Rev Drug Discov**, 2008, 7(1):84-99.

Weber S.J., Abbruscato T.J., Brownson E.A., Lipkowski A.W., Polt R., Misicka A., Haaseth R.C., Bartosz H., Hruby V.J., Davis T.P. *Assessment of an in vitro blood-brain barrier model using several [Met5]enkephalin opioid analogs*. **J Pharmacol Exp Ther**, 1993, 266(3):1649-55.

Weber S.J., Greene D.L., Hruby V.J., Yamamura H.I., Porreca F., Davis T.P. *Whole body and brain distribution of [3H]cyclic [D-Pen2,D-Pen5] enkephalin after intraperitoneal, intravenous, oral and subcutaneous administration*. **J Pharmacol Exp Ther**, 1992, 263(3):1308-16.

Weersink R.A., Bogaards A., Gertner M., Davidson S.R., Zhang K., Netchev G., Trachtenberg J., Wilson B.C. *Techniques for delivery and monitoring of TOOKAD (WST09)-mediated photodynamic therapy of the prostate: clinical experience and practicalities*. **J Photochem Photobiol B**, 2005a, 79(3):211-22.

Weersink R.A., Forbes J., Bisland S., Trachtenberg J., Elhilali M., Brun P.H., Wilson B.C. *Assessment of cutaneous photosensitivity of TOOKAD (WST09) in preclinical animal models and in patients*. **Photochem Photobiol**, 2005b, 81(1):106-13.

Weetall H.H. *Storage stability of water-insoluble enzymes convalently coupled to organic and inorganic carriers*. **Biochimica et biophysica acta**, 1970, 212(1):1-7.

Weitman S.D., Lark R.H., Coney L.R., Fort D.W., Frasca V., Zurawski V.R., Jr., Kamen B.A. *Distribution of the folate receptor GP38 in normal and malignant cell lines and tissues*. **Cancer Res**, 1992, 52(12):3396-401.

Wieczerzak E., Rodziewicz-Motowidlo S., Jankowska E., Gieldon A., Ciarkowski J. *An enormously active and selective azapeptide inhibitor of cathepsin B*. **J Pept Sci**, 2007, 13(8):536-43.

Wieman T.J., Mang T.S., Fingar V.H., Hill T.G., Reed M.W., Corey T.S., Nguyen V.Q., Render E.R., Jr. *Effect of photodynamic therapy on blood flow in normal and tumor vessels*. **Surgery**, 1988, 104(3):512-7.

Wilson B.C., van Lier J.E. *Radiolabelled photosensitizers for tumour imaging and photodynamic therapy*. **J Photochem Photobiol B**, 1989, 3(3):459-63.

Wohrle D., Muller S., Shopova M., Mantareva V., Spassova G., Vietri F., Ricchelli F., Jori G. *Effect of delivery system on the pharmacokinetic and phototherapeutic properties of bis(methyloxyethyleneoxy) silicon-phthalocyanine in tumor-bearing mice*. **J Photochem Photobiol B**, 1999, 50(2-3):124-8.

Woodburn K., Kessel D. *Effect of density-gradients on the binding of photosensitizing agents to plasma proteins*. **Int J Biochem Cell Biol**, 1995, 27(5):499-506.

Woodhams J.H., MacRobert A.J., Novelli M., Bown S.G. *Photodynamic therapy with WST09 (Tookad): quantitative studies in normal colon and transplanted tumours*. **Int J Cancer**, 2006, 118(2):477-82.

Woolard J., Wang W.Y., Bevan H.S., Qiu Y., Morbidelli L., Pritchard-Jones R.O., Cui T.G., Sugiono M., Waine E., Perrin R., Foster R., Digby-Bell J., Shields J.D., Whittles C.E., Mushens R.E., Gillatt D.A., Ziche M., Harper S.J., Bates D.O. *VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression*. **Cancer Res**, 2004, 64(21):7822-35.

Wormser U., Laufer R., Chorev M., Gilon C., Selinger Z. *Proteolytic resistance and biological activity of N-methylated analogs of [pGlu6] substance P6-11*. **Neuropeptides**, 1990, 16(1):41-9.

Yamamoto N., Homma S., Sery T.W., Donoso L.A., Hoober J.K. *Photodynamic immunopotentiation: in vitro activation of macrophages by treatment of mouse peritoneal cells with haematoporphyrin derivative and light*. **Eur J Cancer**, 1991, 27(4):467-71.

Yamazaki Y., Morita T. *Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors*. **Mol Divers**, 2006a, 10(4):515-27.

Yamazaki Y., Morita T. *Molecular and functional diversity of vascular endothelial growth factors*. **Molecular Diversity**, 2006b, 10(4):515-27.

Yamazaki Y., Takani K., Atoda H., Morita T. *Snake venom vascular endothelial growth factors (VEGFs) exhibit potent activity through their specific recognition of KDR (VEGF receptor 2)*. **J Biol Chem**, 2003, 278(52):51985-8.

Yan F., Kopelman R. *The embedding of meta-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin into silica nanoparticle platforms for photodynamic therapy and their singlet oxygen production and pH-dependent optical properties*. **Photochem Photobiol**, 2003, 78(6):587-91.

Zeisser-Labouebe M., Lange N., Gurny R., Delie F. *Hypericin-loaded nanoparticles for the photodynamic treatment of ovarian cancer*. **Int J Pharm**, 2006, 326(1-2):174-81.

Zhang M., Zhang Z., Blessington D., Li H., Busch T.M., Madrak V., Miles J., Chance B., Glickson J.D., Zheng G. *Pyropheophorbide 2-deoxyglucosamide: a new photosensitizer targeting glucose transporters*. **Bioconjug Chem**, 2003, 14(4):709-14.

Zhang X., Gaspard J.P., Chung D.C. *Regulation of vascular endothelial growth factor by the Wnt and K-ras pathways in colonic neoplasia*. **Cancer Res**, 2001, 61(16):6050-4.

Zheng G., Chen J., Stefflova K., Jarvi M., Li H., Wilson B.C. *Photodynamic molecular beacon as an activatable photosensitizer based on protease-controlled singlet oxygen quenching and activation*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 2007, 104(21):8989-94.

Zimcik P., Miletin M., Kopecky K., Musil Z., Berka P., Horakova V., Kucerova H., Zbytovska J., Brault D. *Influence of aggregation on interaction of lipophilic, water-insoluble azaphthalocyanines with DOPC vesicles*. **Photochem Photobiol**, 2007, 83(6):1497-504.

Annexes

Annexes

I. "A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells."

A peptide competing with $VEGF_{165}$ binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells

Loraine Tirand [a], Céline Frochot [b], Régis Vanderesse [c], Noémie Thomas [a], Eric Trinquet [d], Sophie Pinel [e], Marie-Laure Viriot [b], François Guillemin [a], Muriel Barberi-Heyob [a,*]

[a] *Centre Alexis Vautrin-CRAN, UMR 7039 CNRS-UHP-INPL, Avenue de Bourgogne, F-54511 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France*
[b] *DCPR-GRAPP, Groupe ENSIC-UMR 7630 CNRS-INPL, 1 Rue Grandville, F-54000 Nancy, France*
[c] *LCPM, Groupe ENSIC-UMR 7568 CNRS-INPL, 47 Rue Henri Déglin, F-54000 Nancy, France*
[d] *Cis Bio International, Site de Marcoule, F-30204 Bagnols sur Ceze Cedex, France*
[e] *Laboratoire d'Histopathologie Expérimentale et Moléculaire, Faculté de Médecine, 9 Avenue de la forêt de Haye, B.P. 184, F-54505 Vandoeuvre-les-Nancy Cedex, France*

Received 1 August 2005; accepted 23 November 2005
Available online 19 January 2006

Abstract

Destruction of the neovasculature is essential for efficient tumor eradication by photodynamic therapy (PDT). Since the over-expression of receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) is correlated with tumor angiogenesis and subsequent growth, we conjugated a photosensitizer (5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin, TPC), via a spacer (6-aminohexanoic acid, Ahx), to a VEGF receptor-specific heptapeptide (ATWLPPR). ATWLPPR and TPC–Ahx–ATWLPPR bound exclusively to neuropilin-1 (NRP-1) recombinant chimeric protein (IC_{50} = 19 and 171 μM, respectively) but were devoid of affinity for VEGF receptor type 2 (VEGFR-2, KDR), to which ATWLPPR was initially thought to bind. TPC–Ahx–ATWLPPR was incorporated up to 25-fold more in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) than TPC over a 24-h period, and the addition of 8 mM ATWLPPR induced a significant decrease of this uptake ($P < 0.05$), corroborating a receptor-mediated incorporation. Slightly less cytotoxic in the dark, TPC–Ahx–ATWLPPR exhibited enhanced in vitro photodynamic activity (10.4-fold), compared to TPC. Pharmacokinetic analysis in nude mice xenografted with U87 human malignant glioma cells revealed relevant tumor levels as soon as 1 h after intravenous injection of TPC–Ahx–ATWLPPR, and a rapid elimination from the blood compartment. Moreover, TPC–Ahx–ATWLPPR was not degraded in vivo up to 2 h after intravenous injection. Taken together, our results demonstrate that TPC–Ahx–ATWLPPR is a much more potent photosensitizer in vitro than TPC, in NRP-1-expressing cells. Thus, it may efficiently potentiate the vascular effect of PDT in vivo.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Photodynamic therapy; Targeting; Endothelial cells; Neuropilin-1; VEGFR-2 (Flk1/KDR); Human glioma xenografts

1. Introduction

Photodynamic therapy (PDT) is now well established as a clinical treatment modality for various diseases, including cancer [1]. It involves a photosensitizer, light and molecular oxygen, whose combined action results in the formation of singlet oxygen, which is thought to be the main mediator of cellular death induced by PDT. The selectivity of PDT relies both upon the targeting of the light delivery and on the preferential uptake of the photosensitizer by malignant tissue. However, most photosensitizers used in the clinic lack specificity for tumor tissue and tend to accumulate in normal tissue, thus resulting in prolonged skin photosensitivity [1]. In order to circumvent this effect, research is focusing on the synthesis of third generation photosensitizers, which specifically target malignant tissues [2]. Until now, most of the efforts in the development of tumor-targeting photosensitizers have focused on the targeting of markers over-expressed by tumor cells themselves (for a review, see [2]), as we have, for instance, recently described, with the

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 59 83 76; fax: +33 3 83 59 83 78.
E-mail address: m.barberi@nancy.fnclcc.fr (M. Barberi-Heyob).

0168-3659/$ - see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jconrel.2005.11.017

conjugation of a porphyrin to folate [3]. However, PDT effects are mediated not only through direct killing of tumor cells but also through indirect effects, involving both initiation of an immune response against tumor cells and destruction of the neovasculature [1]. The latter effect may indirectly lead to tumor destruction, following deprivation of life-sustaining nutrients and oxygen [1,4]. This vascular effect is thought to play a major part in the eradication of some vascularized tumors by PDT [5]. Indeed, when a tumor reaches a size of 2–3 mm^3, oxygen and nutrients can no longer be supplied by diffusion only, and angiogenesis (i.e. the process by which new blood vessels form by sprouting from pre-existing vessels) is necessary to provide these vital elements to the tumor and support further growth. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is one of the most potent direct-acting angiogenic proteins known [6]. It is up-regulated in the majority of cancers, mainly as a response to hypoxia, and its over-expression is correlated with high micro vascular density and poor prognosis [7,8]. Its two main receptors, VEGFR-1 (Flt-1) and VEGFR-2 (Flk-1/KDR) are located almost exclusively on endothelial cells. Of the two receptors, KDR is generally believed to be the main receptor that mediates VEGF biological activities and thus, plays a major role in tumor-associated angiogenesis. It is over-expressed during angiogenesis [9]. Neuropilins (NRP) have also been identified as receptors of the $VEGF_{165}$ isoform [10]. It was found that, when co-expressed in cells with KDR, NRP-1 enhanced the binding of $VEGF_{165}$ to KDR and $VEGF_{165}$-mediated chemotaxis [10]. These effects may result from the formation of a ternary complex between $VEGF_{165}$, KDR and NRP-1 [11,12]. Neuropilins are expressed specifically in tumor angiogenic vessels and some tumor cells [13]. The specific targeting of VEGF receptors could thus provide an interesting approach for selective and efficient photosensitizer delivery to tumor vessels.

The heptapeptide Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg (ATWLPPR) has been selected by screening a phage epitope library for affinity to an anti-$VEGF_{165}$ neutralizing monoclonal antibody, that was considered to mimic the $VEGF_{165}$ binding site on KDR [14]. This peptide has been shown to displace the binding of $VEGF_{165}$ on Chinese hamster ovary (CHO) cells over-expressing KDR (IC_{50}=80 μM) and to display anti-angiogenic properties, both in vitro and in vivo. Despite the fact that it was thus reported at that time to specifically bind KDR [14], Perret et al. recently showed that a ^{99m}Tc-labeled derivative of ATWLPPR bound to NRP-1, and not to KDR [15].

In this targeting strategy study, we proposed to couple, via a spacer (6-aminohexanoic acid, Ahx), a second generation photosensitizer, 5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin (TPC), to this peptide, in order to improve delivery to HUVEC, that express both NRP-1 and KDR receptors. This paper presents for the first time the synthesis of a photosensitizer targeting NRP-1, a detailed in vitro study of its binding to its molecular and cellular targets and its photodynamic activity in HUVEC. Plasma and tumor levels following intravenous injection of TPC–Ahx–ATWLPPR in nude mice xenografted with U87 human malignant glioma cells were also investigated, in order to assess the ability of the conjugated photosensitizer to accumulate in tumors in vivo.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of ATWLPPR, Ahx–ATWLPPR and TPC–Ahx–ATWLPPR

5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin (TPC) was purchased from Porphyrin Systems (Lübeck, Germany). Wang resin, 9-fluorenyl-methoxy-carbonyl (Fmoc)-amino acids and Fmoc-aminohexanoic acid were from Senn Chemicals International (Gentilly, France). The side chains of threonine and tryptophan were respectively protected by *tertio*-butyl (tBu) and *N-tert*-butoxy-carbonyl (Boc) groups. ATWLPPR, Ahx–ATWLPPR and the peptide conjugated photosensitizer TPC–Ahx–ATWLPPR were synthesized on a multichannel peptide synthesizer, according to a classical Fmoc/tBu solid phase methodology. Assembly of the protected peptide chains was carried out using the in situ neutralization protocol described previously [16]. Double coupling was performed using a 3-fold excess of *N*-Fmoc-amino acid (except during the photosensitizer coupling stage: 2-fold excess and single coupling) and activation reagents *2*-(1*H*-benzotriazol-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyl-uronium tetrafluoroborate (HBTU) (3 eq.), 1-hydroxybenzotriazole (HOBt) (3 eq.) and *N*,*N*-diisopropylethylamine (DIEA) (9 eq.) in dimethylformamide (DMF). During the photosensitizer coupling stage, light exposure was minimized by sealing the reaction vessel in foil to limit the occurrence of unwanted side reactions. A standard cleavage with trifluoroacetic acid (TFA) and scavengers afforded the crude peptides or the peptide-conjugated photosensitizer.

2.2. Purification of ATWLPPR, Ahx–ATWLPPR and TPC–Ahx–ATWLPPR

ATWLPPR and Ahx–ATWLPPR were purified by reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) on a C18 semi-preparative column (250×10 mm I.D., Apollo, Alltech, Lokeren, Belgium) using a 0.1% (v/v) TFA-water/acetonitrile gradient, monitored by absorbance at 280 nm on a SPD-10A UV–visible detector (Shimadzu, France). Both compounds were lyophilized and kept in the dark in aliquots at −20 °C. TPC–Ahx–ATWLPPR was purified on the same column using a 0.1% (v/v) TFA-water/methanol gradient, monitored by absorbance at 280 and 415 nm on the same detector. TPC–Ahx–ATWLPPR was precipitated in hexane, dried and dissolved in dimethylsulfoxide (DMSO) at a concentration of 2 mM, aliquoted and kept in the dark at −20 °C. Chemical identities were established by matrix-assisted laser desorption ionisation–time of flight (MALDI–TOF) mass spectrometry, as described previously [3].

2.3. Photophysical properties

Absorption spectra were recorded on a Perkin-Elmer UV–visible spectrophotometer (Lambda 2, Courtaboeuf, France). Fluorescence spectra were recorded on a SPEX Fluorolog-3 spectrofluorimeter (Jobin Yvon, Longjumeau, France), equipped with a thermostated cell compartment (25 °C), using

a 450 W Xenon lamp. The fluorescence quantum yields (Φ_f) in ethanol and quantum yields of singlet oxygen production ($\Phi(^1O_2)$) were determined as described previously [17].

2.4. Cell line and culture

For in vitro experiments, HUVEC, pooled from several donors, were used (Cambrex, Verviers, Belgium). These cells were routinely grown in endothelial growth medium (EGM-2), containing 2% fetal bovine serum (FBS), growth factors and supplements, and maintained according to the manufacturer's instructions. Only cells from passages 3–7 were used for our experiments. U87 human malignant glioma cells (American Type Culture Collection, HTB-14) were used for in vivo experiments [18]. Cell culture materials were purchased from Costar (Dutscher, Brumath, France). All other chemicals were purchased from Sigma (Saint Quentin Fallavier, France), unless otherwise stated.

2.5. Expression of KDR receptors by flow cytometry analysis

The expression of KDR receptors was assessed by flow cytometry. Briefly, after trypsinization, 2×10^5 cells (HUVEC or U87) were incubated with a monoclonal anti-KDR antibody coupled to phycoerythrin (FAB357P, R&D Systems, Lille, France) during 30 min at 4 °C, according to the manufacturer's recommendations. Analysis was performed on 10^4 cells (FACSCalibur, Becton Dickinson, Meylan, France). Isotype-identical antibodies served as controls.

2.6. Expression of NRP-1 receptors by Western blot

The expression of NRP-1 receptors was analyzed by Western blot. HUVEC and U87 monolayer cells were collected by scraping, washed with ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) and treated with lysis buffer, containing 10 mM Tris–HCl (pH 7.4), 1% CHAPS (3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate), 2 mM ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) and 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) for 30 min on ice, and further centrifuged at 15,000×*g* for 20 min at 4 °C. Total protein concentration was determined using the DC Protein Assay (Bio-Rad, Marnes-la Coquette, France), according to the manufacturer's instructions. Protein samples (25 μg) were heated to 95 °C for 7 min in the presence of 5% 2-mercaptoethanol, chilled on ice and separated on a 7.5% denaturing polyacrylamide gel, followed by electrophoretic transfer to polyvinylidene difluoride membranes. Membranes were blocked with 5% (w/v) non-fat dry milk in Tris-buffered saline containing 0.1% (v/v) Tween-20 (TBST), overnight at 4 °C. Membranes were then incubated for 1 h with NRP-1 antibody (sc-7239, Santa Cruz Biotechnology, Tebu, Le Perray en Yvelines, France), diluted 1:200 in 5% (w/v) nonfat dry milk in TBST. After several washes, the blots were incubated with secondary anti-goat antibody linked to horseradish peroxidase (1:2000). Bound antibody was detected using the ECL detection system (Amersham Biosciences, Orsay, France) and visualized by autoradiography. To ensure equal loading of proteins, blots were subsequently stripped and probed with a goat antibody to actin (sc-1616, Santa Cruz Biotechnology), using the procedure described above.

2.7. Dark cytotoxicity

Cell survival after incubation with photosensitizers in the dark was measured using a 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) assay. Briefly, HUVEC were plated at an initial cell density of 5×10^3 cells/well in 96-well microtitration plates and allowed to attach overnight. Wells were then emptied, rinsed twice with PBS and filled with 200 μL EGM-2 containing various concentrations of TPC or TPC–Ahx–ATWLPPR (from 1 to 50 μM). After a 24-h incubation at 37 °C, wells were emptied, rinsed twice with cold PBS and filled with 200 μL EGM-2. Cell survival was measured 24 h later, as described previously [3,17]. Experiments were carried out in triplicates.

2.8. Photosensitizers uptake

2.8.1. Kinetic experiments

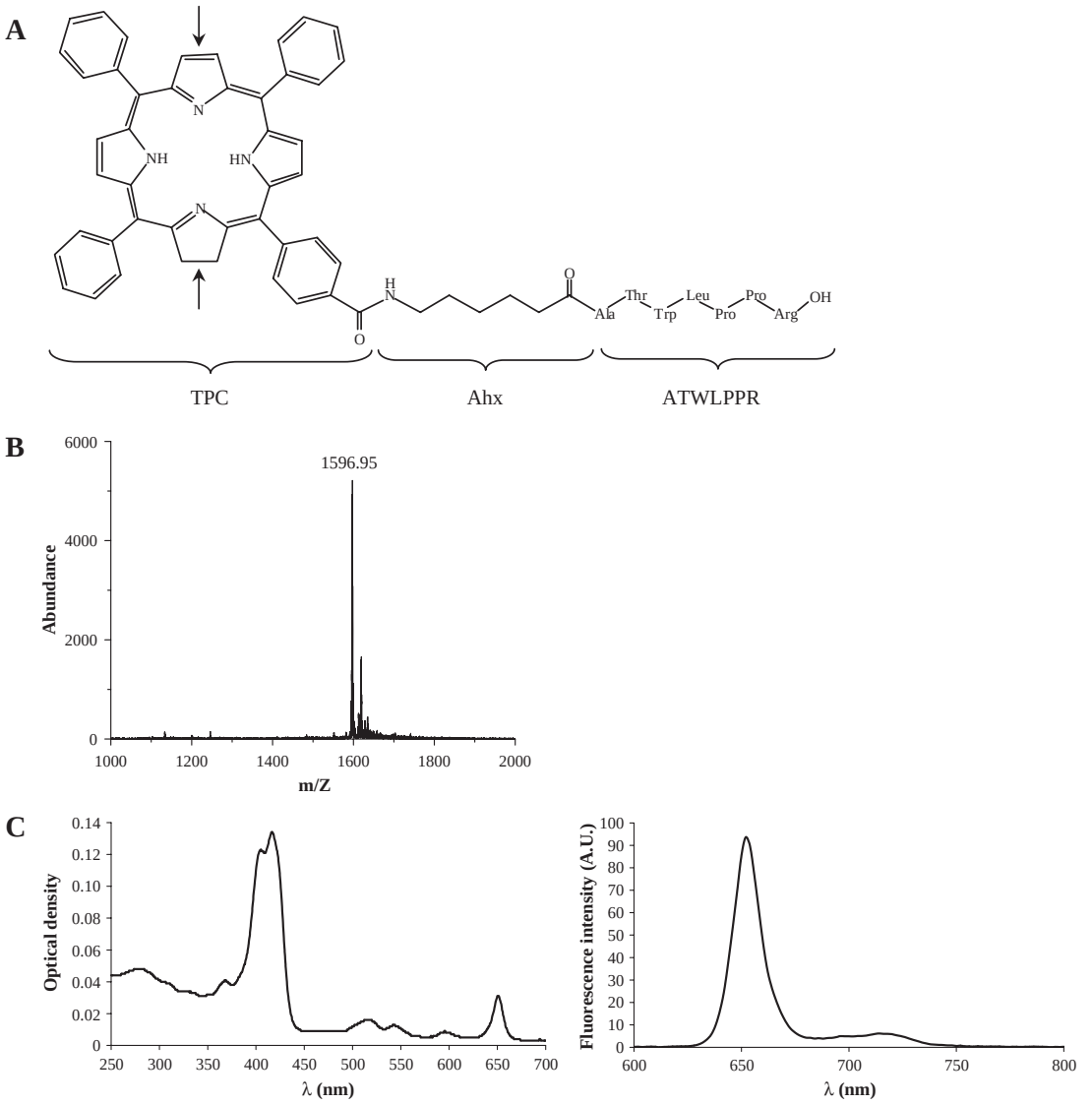
HUVEC were seeded in T-25 flasks (7000 cells/cm^2). After 3 days, medium containing various concentrations of TPC or TPC–Ahx–ATWLPPR was added for different times, ranging from 1 to 24 h. Medium was then removed, cells were rinsed twice with cold PBS and trypsinized. After cell counting on a hemacytometer, cells were centrifuged (1200×*g* for 5 min) and re-suspended in ethanol. Photosensitizer was extracted by a 10-min sonication (Branson 1200, Roucaire Instruments Scientifiques, Les Ulis, France). Cell debris were removed by centrifugation (3500×*g* for 15 min). Fluorescence (recorded at 652 nm following excitation at 415 nm) was measured on a flx-Xenius spectrofluorimeter (SAFAS, Monaco) and concentrations were deduced from a calibration curve. Results are displayed in fmol/cell. Experiments were carried out at least in triplicates.

2.8.2. Competition experiments

For experiments in competition with an excess of ATWLPPR peptide, HUVEC were seeded onto 6-well tissue culture plates at 2×10^5 cells/well and incubated for 1 day at 37 °C. The medium was then replaced with endothelial basal medium containing 0.5% FBS and no supplement (starvation medium) for an overnight incubation. Under strictly subdued light conditions, the medium was then replaced with fresh starvation medium containing 2.5 μM of either conjugated or unconjugated (negative control) photosensitizer in the presence, or absence, of an excess (8 mM) of ATWLPPR peptide. After a 3-h incubation period in the dark, cells were washed three times with cold PBS and trypsinized. Half of the cells were used for quantification of incorporated photosensitizer, as described above, and the other half was used for total protein quantification, using the DC Protein Assay (Bio-Rad). Experiments were carried out in triplicates.

2.9. Vizualisation of intracellular uptake by fluorescence microscopy

The intracellular uptake of TPC and TPC–Ahx–ATWLPPR by HUVEC was visualized by fluorescence microscopy. Briefly, HUVEC were cultured in Slideflasks (Nunc, PolyLabo, Strasbourg, France) during 3 days, followed by an incubation with TPC or TPC–Ahx–ATWLPPR (1 μM) during 24 h. After washing, fluorescence microscopy was performed with an upright epifluorescence microscope (AX70 Provis, Olympus, Rungis, France), equipped with a 100 W mercury vapor lamp, using a filter set consisting of a 400–440 nm band pass excitation filter, associated with a 570 nm dichroic mirror and a 590-nm-long pass filter. Neutral density filters were used in



D

	Soret	Q_{IV}	Q_{III}	Q_{II}	Q_I	Φ_f	Φ ($^1O_2$)
	ε_{415}	ε_{516}	ε_{543}	ε_{598}	ε_{651}		
TPC	76	8	5	4	12	0.18	0.47
TPC-Ahx-ATWLPPR	74	6.8	4.9	2.6	15	0.18	0.39

Fig. 1. Chemical structure and photophysical characteristics of TPC–Ahx–ATWLPPR. (A) Chemical structure of one of the isomers of the conjugate TPC–Ahx–ATWLPPR. Arrows indicate the two possible sites of double bond reduction during synthesis of a chlorin from a porphyrin, leading to a mixture of two isomers. (B) MALDI–TOF MS spectrum of TPC–Ahx–ATWLPPR. (C) Absorption (left) and emission (right) spectra of TPC–Ahx–ATWLPPR in ethanol. (D) Molar extinction coefficients (expressed in 10^3 M^{-1} cm^{-1}) determined at different maximum wavelengths $(\varepsilon)_\lambda$, fluorescence quantum yields (Φ_f) and singlet oxygen quantum yields $\Phi(^1O_2)$ of TPC and TPC–Ahx–ATWLPPR.

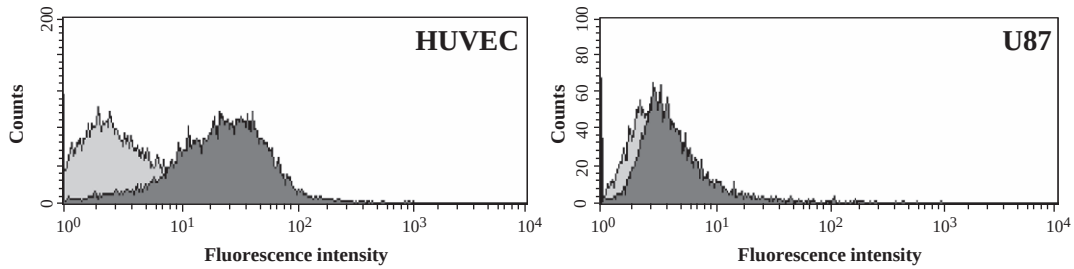


Fig. 2. Flow cytometry measurement of KDR receptor expression by HUVEC and U87 cells. Cells treated with: light grey, isotype control; dark grey, anti-KDR coupled to phycoerythrin.

order to reduce photobleaching phenomenon. Fluorescence images were recorded using a ×40 objective during a strictly controlled integration time. The same conditions (light intensity, objective, integration time) were used for both photosensitizers, to allow comparison.

2.10. Binding of ATWLPPR, Ahx–ATWLPPR and TPC–Ahx–ATWLPPR to recombinant KDR and NRP-1 proteins

For measurements of the binding affinities of ATWLPPR, Ahx–ATWLPPR and TPC–Ahx–ATWLPPR, the surface of Maxisorp microplates (Dutscher) was coated with either KDR or NRP-1 recombinant chimeric proteins (R&D Systems), overnight at room temperature. The plates were blocked with PBS containing 0.5% (w/v) bovine serum albumin (blocking buffer) for 1 h at 37 °C, to prevent non-specific interactions. Biotinylated $VEGF_{165}$ (R&D Systems) was then added to the coated wells in the presence of 2 µg/mL heparin, in competition, or not, with various concentrations of ATWLPPR, Ahx–ATWLPPR, TPC–Ahx–ATWLPPR or unlabelled $VEGF_{165}$ (R&D Systems), as a positive control. In the case of TPC–Ahx–ATWLPPR, 0.5% (v/v) Tween-20 was added to the blocking buffer in order to allow for its solubilization. After a 2-h incubation at room temperature, the plates were washed and the amount of bound biotinylated $VEGF_{165}$ stained with streptavidin horseradish peroxidase conjugate (R&D Systems) and assayed. Reported values are the average of triplicate measurements. Affinities were estimated as IC_{50} values – i.e. the concentration of competitor (ATWLPPR, Ahx–ATWLPPR or TPC–Ahx–ATWLPPR) that displaced 50% of biotinylated $VEGF_{165}$ binding – using the medium effect method [19].

2.11. Photodynamic activity

Photodynamic activity on HUVEC was assessed by clonogenic assays. As a preliminary experiment, we assessed plating efficiency by increasing number of plated HUVEC from 200 to 1000 cells/Petri dish (100-mm diameter, Dutscher) and a number of 500 cells/Petri dish was considered as optimal. 24 h after plating, cells were exposed for 24 h to photosensitizers (0.1 µM), washed twice with PBS and irradiated. Irradiation was carried out at 652 nm, using a dye laser (SpectraPhysics 375B, Les Ulis, France), pumped with an argon laser (Spectra-Physics 2020). The output power was 318 mW. The light spot was 9 cm in diameter, providing a fluence rate of 5 mW/cm^2. Light doses ranged from 0.1 to 4.0 J/cm^2. During irradiation, the temperature never exceeded 24±2 °C. This temperature did not influence cell viability. Following treatment, the dishes were incubated for 12 days and the resulting colonies (>50 cells) were fixed with ethanol, stained with crystal violet and counted. Caution was taken to avoid exposure of cells to light before and after irradiation. Negative controls were photosensitizer-free medium without photo-irradiation, photosensitizer-free medium with photo-irradiation, photosensitizer-containing medium without photo-irradiation. Experiments were carried out in triplicates at different days. Irradiation doses yielding 50% growth inhibition (LD_{50}) were determined using the medium effect method [19].

2.12. Animals and tumor model

Female athymic Swiss nude mice (*nu/nu*) were obtained from Harlan (Gannat, France), and used at 7–9 weeks old and weighed 20–25 g. Animal procedures were performed according to institutional and national guidelines. The model of human malignant glioma was obtained using U87 cells, as described previously [18]. The tumor was maintained in vivo by sequential passages in nude mice. For the experiments, source tumors were excised, cleaned from necrotic tissue, cut into small chunks, and transplanted subcutaneously in either of the hind legs of each mouse.

2.13. Pharmacokinetic study

When tumors reached a size of about 5 mm in diameter, TPC–Ahx–ATWLPPR (0.7 or 2.8 mg/kg) dissolved in polyethylene glycol (PEG) 400–ethanol–water (30:20:50, v/v/v) was injected intravenously via the tail vein, and mice were kept in the dark. After a time ranging from 1 to 48 h, mice were

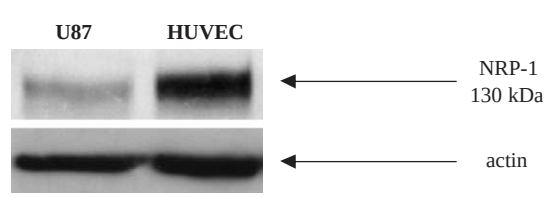


Fig. 3. Western blot analysis of neuropilin-1 receptor expression by U87 and HUVEC. Actin serves as a loading control.

anesthetized by intraperitoneal injection of 0.01 mL/g of body weight of a solution containing 6 mg/mL ketamine (Panpharma, Fougères, France) and 0.8 µg/mL xylazine (Bayer Pharma, Puteaux, France). Blood samples were collected in heparinized tubes by cardiac puncture, and centrifuged at 1500×*g* for 10 min at 4 °C. Mice were sacrificed by cervical dislocation and the tumor was carefully excised, rinsed with saline and blotted dry. At least three animals were used per time point. All samples were protected from light. Blood and tumor samples were weighed and kept at −80 °C in polypropylene tubes, until further processing. Extraction of the photosensitizer from the tumor required first a solubilization step, using TEM buffer (10 mM Tris, 1.66 mM EDTA, 5 mM molybdate, pH 7.4) and homogenization. Then, the procedure for both plasma and tumor extracts preparation was carried out as described previously [20], with slight modifications, and involved solvent precipitation using methanol combined with DMSO (5:0.1, v/v). Analyses were performed by RP-HPLC on a C18 column (250×4.6 mm I.D., YMC, Interchim, France), under isocratic elution conditions with a mobile phase of methanol–H_2O (95:5, v/v) and a fluorescence detection with excitation and emission wavelengths of 416 and 652 nm, respectively. TPC–Ahx–ATWLPPR levels in the plasma and tumor were determined as a percentage of the injected dose per gram tumor (% injected dose/g) or per milliliter plasma. The plasma pharmacokinetics was analyzed by a non-compartmental method, according to Cramers et al. [21] and Jones et al. [22].

2.14. Statistical analysis

Unless otherwise indicated, all data are mean values± standard deviation (S.D.) calculated from at least three independent experiments. Spearman's rank correlation was used to test the correlation between different parameters and Mann–Whitney *U* test was used to test for the significant level between independent variables. The level of significance was set to $P<0.05$.

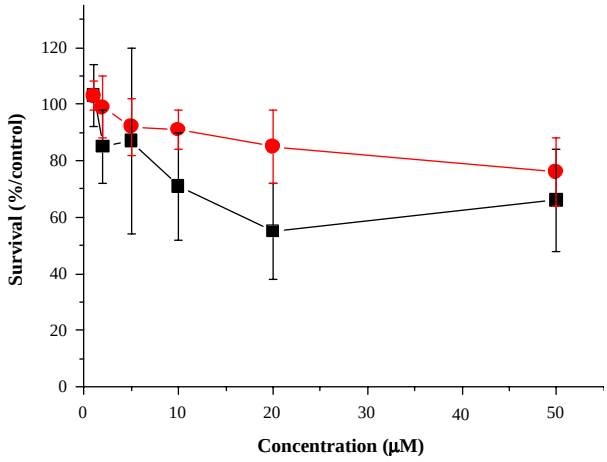


Fig. 4. Dark cytotoxicity of TPC (■) and TPC–Ahx–ATWLPPR (●) in HUVEC, according to concentration, as determined by MTT test (data points show the mean±S.D., $n=3$).

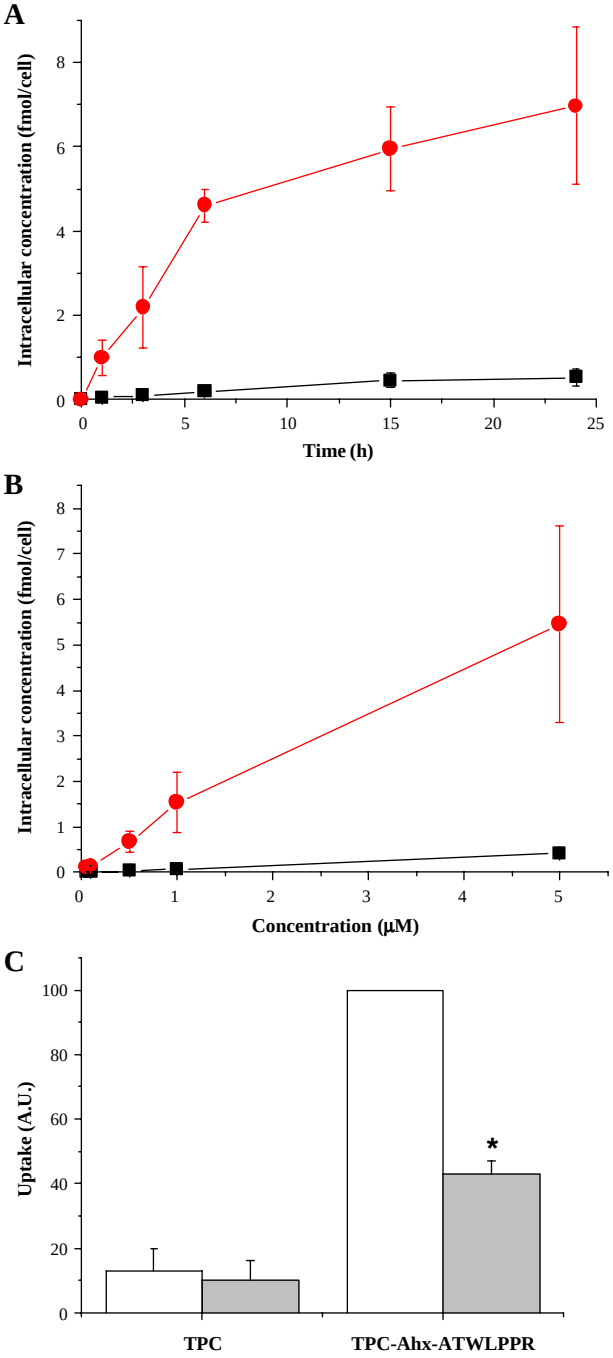


Fig. 5. Uptake of TPC and TPC–Ahx–ATWLPPR in HUVEC. (A) Uptake kinetics of TPC (■) and TPC–Ahx–ATWLPPR (●). HUVEC were incubated with photosensitizers at 5 µM. Cellular fluorescence intensities after extraction were measured at 652 nm following excitation at 415 nm and intracellular concentrations were deduced from a calibration curve (data points show the mean±S.D., $n=3$ or 4). (B) Concentration dependence of the uptake of TPC (■) and TPC–Ahx–ATWLPPR (●). HUVEC were incubated with photosensitizers for 24 h at concentrations ranging from 0.1 to 5.0 µM. Intracellular concentrations were calculated as described in A (data points show the mean ±S.D., $n=3$). (C) Intracellular concentration of TPC and TPC–Ahx–ATWLPPR in HUVEC in the presence, or absence, of ATWLPPR. HUVEC were incubated with either photoactive compound (2.5 µM for 3 h), with, or without, a competing concentration of ATWLPPR at 8 mM (data points show the mean± S.D., $n=3$). *$P<0.05$ vs. control without ATWLPPR.

3. Results

3.1. Synthesis and characterization of ATWLPPR, Ahx–ATWLPPR and TPC–Ahx–ATWLPPR

ATWLPPR, Ahx–ATWLPPR and TPC–Ahx–ATWLPPR were obtained with a final purity greater than 95%, as assessed by analytical RP-HPLC. In the case of TPC–Ahx–ATWLPPR, two isomers, corresponding to the reduction of a double bond on either opposing side of the tetrapyrrolic macrocycle could be observed by analytical RP-HPLC (not shown). These isomers arise from the asymmetrical character of the molecule (Fig. 1A) and could also be observed in the commercial TPC used for synthesis. In our study, coupling using solid-phase synthesis allowed site-specific conjugation of the photosensitizer to the amino-terminus of the ATWLPPR peptide in a one to one ratio. This site of attachment on the peptide was chosen for simplicity reasons during synthesis and, more importantly, because the arginine at the carboxy-terminus of the peptide has been shown to be essential for activity [23]. A linker (Ahx) was used to attach the peptide to the photosensitizer, in order to ensure relative individualization of the two moieties of the molecule, and thus to preserve the attractive photophysical characteristics of the photosensitizer TPC and the specificity of ATWLPPR for receptors to VEGF.

Identities of ATWLPPR, Ahx–ATWLPPR and TPC–Ahx–ATWLPPR were confirmed by MALDI–TOF mass spectrometry ($[TPC–Ahx–ATWLPPR+H]^+$: found, $m/z=1596.95$; calculated, 1596.88, Fig. 1B).

The absorption spectrum of TPC–Ahx–ATWLPPR was typical of chlorin derivatives (Fig. 1C), with the Q_I band having the highest molar extinction coefficient among the four Q bands (Fig. 1D). Conjugation with ATWLPPR did not induce significant variations in molar extinction coefficients, fluorescence and singlet oxygen quantum yields compared to TPC (Fig. 1D).

3.2. Expression of VEGF receptors by HUVEC

In order to validate the use of HUVEC for in vitro cellular experiments, the expression of receptors to $VEGF_{165}$ (KDR and NRP-1) was investigated. HUVEC strongly expressed KDR receptors, as assessed by flow cytometry (Fig. 2A). Western blot analysis revealed the presence of high levels of NRP-1 receptors, as shown by a strong band at 130 kDa (Fig. 3). Taken together, these results confirm that HUVEC express KDR and NRP-1 receptors, which validates their use as an in vitro model for our study.

3.3. Dark cytotoxicity

A MTT test was used to evaluate the dark cytotoxicity of TPC and TPC–Ahx–ATWLPPR for concentrations ranging from 0.05 to 50.00 μM. A 24-h incubation of HUVEC in the absence of light exposure with either photoactive compound yielded a surviving cell fraction higher than 85% for concentrations up to 5.00 μM (Fig. 4). TPC–Ahx–ATWLPPR displayed lower dark cytotoxicity than TPC for all concentrations tested. All subsequent experiments were carried out at non-cytotoxic concentrations inferior to 5.0 μM.

3.4. Intracellular uptake

The cellular uptake of TPC, used as a reference in this study, and of the conjugate TPC–Ahx–ATWLPPR, according to incubation time, was examined in the dark, at a non-cytotoxic concentration of 5.0 μM. Fig. 5A shows that the conjugate TPC–Ahx–ATWLPPR accumulated up to 25 times more in NRP-1 and KDR-expressing HUVEC than TPC over a 24-h period (7.0±1.9 versus 0.5±0.2 fmol/cell, at 24 h). This uptake distinction was statistically significant over the 24-h incubation period ($P<0.05$). Moreover, the linear relationships between initial concentrations of TPC and TPC–Ahx–ATWLPPR, respectively, in the medium (0.1–5.0 μM), and the

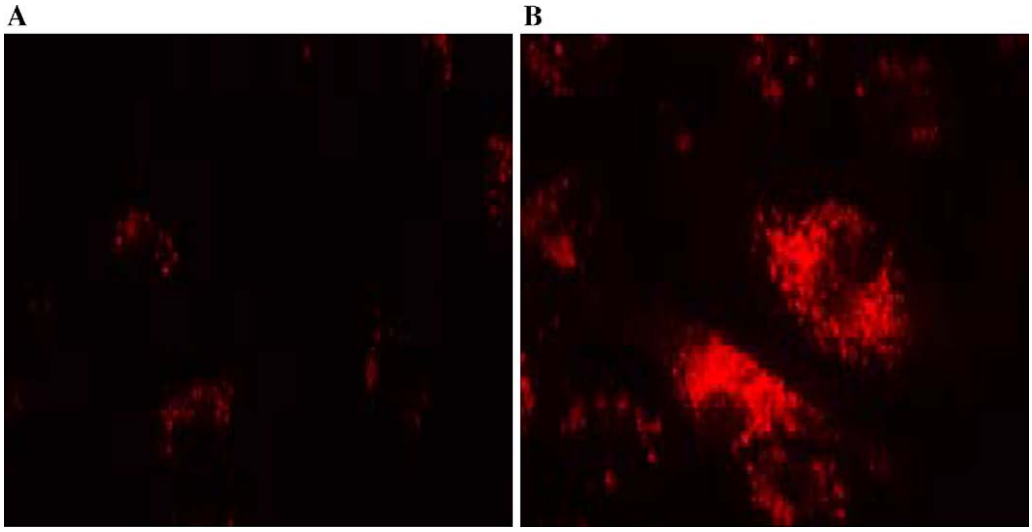


Fig. 6. Visualization of cellular uptake by fluorescence microscopy for HUVEC exposed for 24 h to TPC (A) and TPC–Ahx–ATWLPPR (B), both at 1 μM.

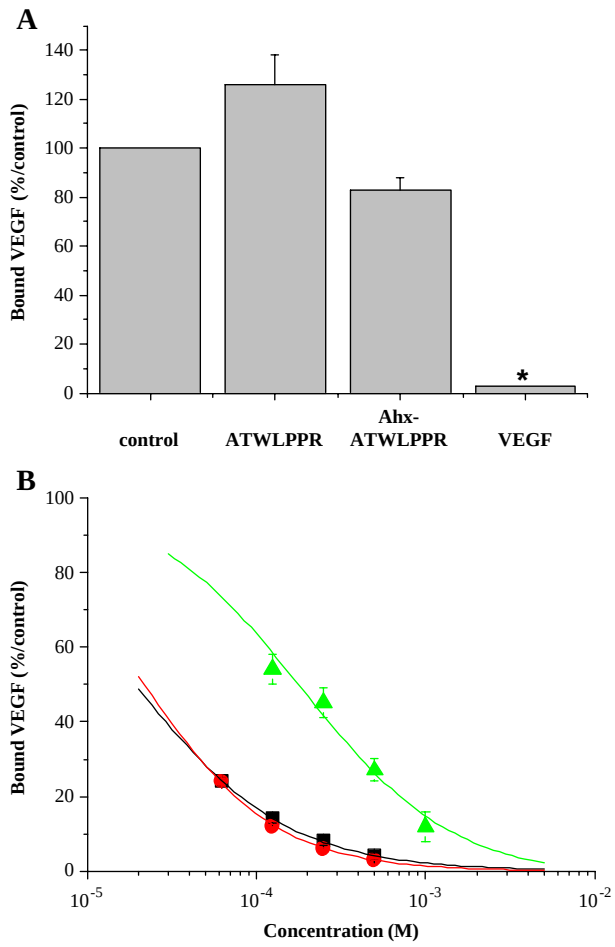


Fig. 7. Binding of ATWLPPR, Ahx–ATWLPPR and TPC–Ahx–ATWLPPR to recombinant KDR and NRP-1 proteins. (A) Binding of ATWLPPR and Ahx–ATWLPPR to KDR. Binding of biotinylated VEGF (20 ng/mL; 450 pM) to KDR in the presence of 2 μg/mL heparin was evaluated in the absence (control), or presence, of ATWLPPR at 5 mM, Ahx–ATWLPPR at 5 mM or VEGF at 2 μg/mL (45 nM) (data points show the mean±S.D., $n=3$). *$P<0.05$ vs. control. (B) Binding of ATWLPPR, Ahx–ATWLPPR and TPC–Ahx–ATWLPPR to NRP-1. Binding of biotinylated VEGF (5 ng/mL; 110 pM) to NRP-1 in the presence of 2 μg/mL heparin was evaluated when increasing concentrations of ATWLPPR (■), Ahx–ATWLPPR (●) (62.5–500.0 μM) or TPC–Ahx–ATWLPPR (▲) (125–1000 μM) were added (data points show the mean±S.D., $n=3$).

amount of photosensitizer per cell after a 24-h incubation period, indicate that the uptake of TPC–Ahx–ATWLPPR by HUVEC is not dependent on the concentration used and is always higher than TPC (Fig. 5B). The correlation was statistically significant ($R=1.000$, $P=0.0455$, for both compounds).

Because this enhanced accumulation of TPC–Ahx–ATWLPPR, compared to TPC, could reflect not only intracellular uptake but also binding to the membrane without internalization, fluorescence microscopy experiments were undertaken to visualize intracellular uptake. The cells exhibited very intense and diffuse intracellular fluorescence following incubation with TPC–Ahx–ATWLPPR, compared to TPC used at the same concentration (Fig. 6). This fluorescence emission appeared restricted to the cytoplasmic compartment with no detectable nuclear staining.

Further studies indicated that the medium was progressively depleted of TPC–Ahx–ATWLPPR (initial concentration 5 μM) in a time-dependent manner, with only 56±9% and 14±7% of the initial photosensitizer remaining in the medium after a 6-h and a 24-h incubation period with HUVEC, respectively. This depletion phenomenon was not observed with TPC (94±4% and 89±3% of photosensitizer remaining after a 6-h or a 24-h exposure, respectively). This suggests that the incorporation of TPC–Ahx–ATWLPPR, and not of TPC, in HUVEC, occurs against a concentration gradient. Therefore, the uptake of TPC–Ahx–ATWLPPR is very likely related to an active transport mechanism.

3.5. Uptake inhibition studies

Competitive uptake experiments were performed to compare the cellular accumulation in HUVEC of TPC–Ahx–ATWLPPR (2.5 μM), in the absence, or in the presence, of an excess of ATWLPPR (8 mM). A statistically significant decrease (2.3-fold, $P=0.0369$) was measured, when ATWLPPR was added, compared to incubation without ATWLPPR. On the contrary, no competition was observed in the case of TPC (Fig. 5C). This suggested that the enhanced accumulation of TPC–Ahx–ATWLPPR in HUVEC (Fig. 5A) was related to ATWLPPR specificity for receptors to VEGF.

In order to explore which VEGF receptors the synthesized conjugate TPC–Ahx–ATWLPPR could target, its binding to KDR and NRP-1 recombinant proteins was assessed.

3.6. Binding to KDR and NRP-1 proteins

As $VEGF_{165}$ binding to its receptors is heparin-dependent, the competitive binding experiments were carried out in the presence of heparin. ATWLPPR and Ahx–ATWLPPR failed to displace the binding of biotinylated $VEGF_{165}$ to KDR, unlike the positive control unlabeled $VEGF_{165}$ (Fig. 7A). On the

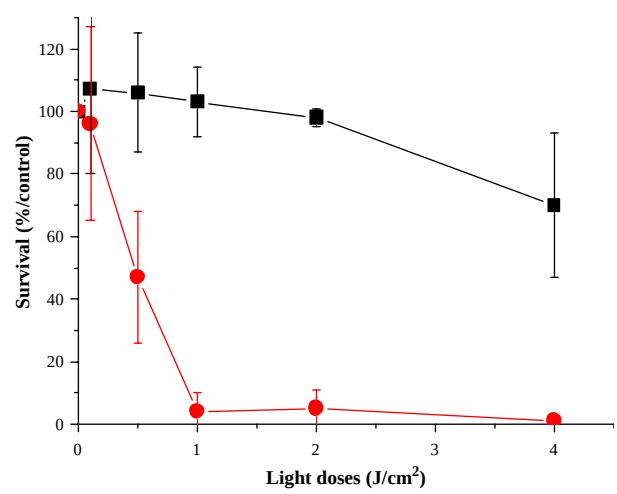


Fig. 8. Measurement of photodynamic therapy sensitivity to TPC (■) and TPC–Ahx–ATWLPPR (●) in HUVEC. Cells were incubated with photosensitizers at 0.1 μM for 24 h before light treatment. Survival curves, obtained by clonogenic assays, were obtained for cells exposed to increasing doses of light from 0.1 to 4.0 J/cm^2 (data points show the mean±S.D., $n=3$).

contrary, binding of biotinylated $VEGF_{165}$ to NRP-1 was displaced by ATWLPPR and Ahx–ATWLPPR in a concentration-dependent manner (IC_{50} = 19 and 22 μM, respectively) (Fig. 7B). TPC–Ahx–ATWLPPR showed affinity for NRP-1 (IC_{50} = 171 μM, Fig. 7B), although to a lesser extent than ATWLPPR. Therefore, the conjugate TPC–Ahx–ATWLPPR binds to NRP-1 but not to KDR.

3.7. Photodynamic activity

HUVEC were incubated with either of the photoactive compounds (TPC or TPC–Ahx–ATWLPPR) and irradiated by red light, as we previously described [3]. Fig. 8 shows that, whereas the control photosensitizer TPC displayed little photodynamic activity in HUVEC under these conditions, conjugation with ATWLPPR significantly enhanced photodynamic activity (10.4-fold). LD_{50} values, after incubation with either TPC–Ahx–ATWLPPR or TPC, were 0.47 ± 0.23 and 4.9 ± 0.64 J/cm^2, respectively. This wide difference in photocytotoxicity was consistent with the dissimilar accumulation of the photoactive compounds in HUVEC (Fig. 5A).

3.8. Blood and tumor pharmacokinetic study

The U87 human malignant glioma model used in our in vivo study was selected as we had previously evidenced a significant tumor vascularization on this tumor model xenografted in nude mice, by studying tumor vascular density [18]. TPC–Ahx–ATWLPPR was administered intravenously (0.7 or 2.8 mg/kg), for an easier access to endothelial cells lining the vasculature. The first dose of 0.7 mg/kg is the equivalent molar dose of *m*-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (Foscan®, Temoporfin) at 0.3 mg/kg, a dose that is widely used for PDT treatments [21,22]. Plasma pharmacokinetic parameters were comparable for both doses (Fig. 9A). They validate a rapid elimination from the blood compartment, compared to Foscan® [21,22]. TPC–Ahx–ATWLPPR accumulated rapidly and at high levels in the tumor, with 2.3% and 2.2% of injected dose per gram of tumor tissue at 1 h and 6 h after injection, respectively. Then, tumor levels of TPC–Ahx–ATWLPPR appeared to decline steadily between 6 h and 48 h (Fig. 9B). The disappearance of TPC–Ahx–ATWLPPR from the tumor tissue is correlated with the appearance of another photoactivable compound at the same time. This product, detected by HPLC from 4 h after injection, results from hydrolytic degradation of the peptide moiety of TPC–Ahx–ATWLPPR, and not of the macrocyclic photoactivable part, as assessed by mass spectrometry analysis (not shown). Therefore, if we take into account TPC–Ahx–ATWLPPR degradation, the tumor levels of total photoactivable compounds are even higher than those presented on Fig. 9B.

4. Discussion

Vascular damage is considered to be a major phenomenon occurring during PDT of tumors [24,25], that largely contributes to its efficacy [21,26]. This vascular effect can be potentiated either by changing PDT scheduling (i.e. by decreasing drug–light interval), or by designing photosensitizers localizing primarily in the vascular compartment. The first method has been used by Kurohane et al.: laser irradiation 15 min after

A

Pharmacokinetic parameters	0.7 mg/kg	2.8 mg/kg
Mean residence time (MRT)	15.8 h	19.0 h
Elimination constant (K_{el})	0.063 /h	0.053 /h
Half-life ($t_{1/2}$)	10.9 h	13.2 h
Plasma clearance (C_L)	49 mL/kg/h	36 mL/kg/h
Volume of distribution (V_d)	780 mL/kg	685 mL/kg

B

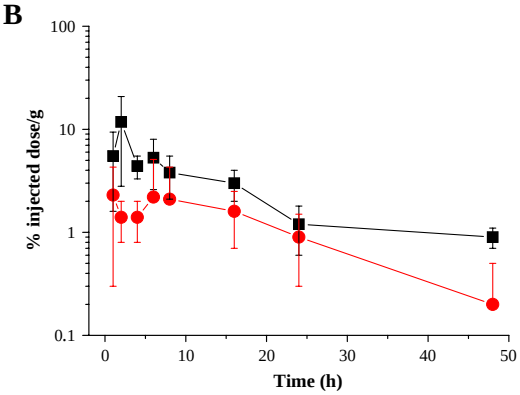


Fig. 9. Pharmacokinetic analyses. (A) Plasma pharmacokinetic parameters, with a dose of 0.7 or 2.8 mg/kg of TPC–Ahx–ATWLPPR, calculated using a non-compartmental method. (B) TPC–Ahx–ATWLPPR, as a percentage of the injected dose per g tumor (●) or per mL plasma (■), expressed as a function of time after an i.v. injection with 2.8 mg/kg (data points show the mean ± S.D., *n* = 3 or 4).

injection of the liposomal benzoporphyrin derivative monoacid ring BPD-MA caused hemostasis due to damage to angiogenic endothelial cells. This approach suppressed tumor growth more efficiently than conventional PDT [27]. The second approach involves the use of "vascular-targeting" agents that aim to destroy the neovasculature already formed, and which have to be distinguished from anti-angiogenic agents acting on the angiogenic process itself [28,29]. Recently, Ichikawa et al. modified a PEG-coated-liposomal BPD-MA, with the APRPG-pentapeptide, that specifically binds to tumor angiogenic sites [5]. Although increased uptake of photosensitizer by tumor tissue was solely attributable to the PEG moiety, conjugation to APRPG was necessary to suppress tumor growth efficiently. It was hypothesized that APRPG allowed intracellular internalization of the photosensitizer, which would otherwise be mainly located in the interstitial space of the tumor, where short-lived singlet oxygen could not exert any cytotoxic action. This validates the interest of using an active-targeting strategy, which allows efficient cellular internalization of the photosensitizer.

Ideally, vascular targeting requires the identification of a target on the surface of angiogenic endothelial cells and of a molecule that specifically bind to it. KDR, the human form of the type 2 receptor for VEGF, represents an ideal candidate for vascular-targeting strategies: it is internalizable and expressed selectively in activated tumor endothelial cells, compared to normally quiescent endothelium. The heptamer peptide ATWLPPR has been selected by phage display [14], and was first described as an antagonist of $VEGF_{165}$ binding to KDR. At that time, NRP-1 had only recently been identified as a receptor for $VEGF_{165}$ [10]. NRP-1 is a 130-kDa non-tyrosine kinase transmembrane protein, originally known as a receptor for members of the semaphorin/collapsin family of secreted polypeptides implicated in axonal guidance and neuronal patterning [30]. More recently, it has also been found on the surface of endothelial cells and some tumor cells [10] and up-regulated by VEGF during pathological angiogenesis through a KDR-dependent pathway [31].

In the present study, we have demonstrated, in agreement with others [15,23], that our new ATWLPPR-conjugated photosensitizer targeted NRP-1 and not KDR. Nevertheless, since its identification, ATWLPPR continues to be considered mistakenly as a KDR-specific peptide, and has been used in targeting strategies, both in vitro and in vivo [32,33], and for studies of signaling via this receptor [34,35]. It has even been used as a control peptide for KDR, for comparison with a peptide specific for NRP-1 [36]. ATWLPPR has also been shown to bind NRP-2, but this is unlikely for TPC–Ahx–ATWLPPR, as the amino-terminus of ATWLPPR must be left intact for affinity for NRP-2 [15].

A linker (Ahx) was used as a spacer to couple TPC to ATWLPPR, in order to individualize these two moieties. Photophysical properties of TPC were conserved following conjugation to Ahx–ATWLPPR. Conjugation with Ahx alone did not interfere with ATWLPPR binding on NRP-1. This is not surprising since coupling at the amino-terminus of this peptide has already been shown to be non-detrimental to ATWLPPR affinity for NRP-1 [15]. Nevertheless, affinity for NRP-1 decreased following coupling to TPC. Reasons for this may include intramolecular interactions between TPC and ATWLPPR and steric hindrance due to the TPC moiety. In our previous work, folic acid was conjugated to 4-carboxyphenylporphyrin via two short linkers (hexane-1,6-diamine or 2,2′-(ethylenedioxy)-bis-ethylamine), which were different in nature but similar in size [3]. Both conjugated photosensitizers showed improved intracellular uptake and photodynamic activity in KB cells, compared to the unconjugated photosensitizer. Nevertheless, we did not test the influence of varying spacer length on receptor affinity. The presence of a spacer brings flexibility to the molecule, and its length, as well as the nature of the molecule attached to it, may impact on receptor affinity [37,38].

The increased photodynamic activity of TPC–Ahx–ATWLPPR, compared to TPC, was consistent with their dissimilar accumulation in HUVEC. However, the addition of ATWLPPR in excess did not decrease the uptake of TPC–Ahx–ATWLPPR to the level of TPC, suggesting that part of the increased uptake of TPC–Ahx–ATWLPPR was related to non-specific mechanisms. Actually, most photosensitizers are hydrophobic, highly adsorptive, and tend to aggregate in aqueous media as a result of the propensity of the hydrophobic skeleton to avoid contact with water molecules [39]. In our in vitro experimental conditions, photosensitizers could not be diluted in compatible biological medium without forming insoluble aggregates, which could increase uptake in an aspecific manner, through passive diffusion or endocytosis of aggregated photosensitizer molecules, depending on photosensitizer chemical structure and hydrophobicity. Aspecific uptake was also evidenced in our previous work with photosensitizer conjugated to folic acid [3].

In vivo, the strategy of destroying angiogenic endothelial cells may offer some advantages over the usual approach aimed at direct killing of tumor cells [29,40]. Indeed, a single vessel provides the nutrition for hundreds or thousands of tumor cells and has to be damaged at only one point to block blood flow upstream and downstream [29]. Moreover, vascular endothelial cells are adjacent to the blood stream, ensuring adequate drug delivery, whereas access to the tumor tissue is sometimes impeded by an aberrant vasculature and high interstitial pressures [28,29,41]. The molecular oxygen required for photochemical reactions is also more readily available. Last but not least, because of the variety of mutations among different tumor types, the resulting heterogeneous marker expression makes it impossible to use only one molecule to target all types of tumors. On the contrary, endothelial cells lining angiogenic blood vessels of different tumors are likely to have a similar pattern of marker expression. Therefore, anti-neovascular PDT could be used with a large number of vascularized tumors.

We have previously shown a significant tumor vascularization on a model of U87 human malignant glioma cells xenografted in nude mice [18], which made it attractive for our in vivo study. Moreover, as previously reported [42], we have shown that U87 cells expressed NRP-1 receptors, albeit to a lesser extent than HUVEC (Fig. 3), which suggests that TPC–Ahx–ATWLPPR could target U87 tumor cells themselves, as

well as tumor endothelial cells. Interestingly, NRP-1 levels in corresponding healthy brain tissue are low [10].

TPC–Ahx–ATWLPPR accumulated rapidly in the tumor at relevant levels, which could reach 2.3% of injected dose per gram of tumor tissue, 1 h after intravenous injection. This value is about 4.9-fold higher than Foscan® for the same time after injection [21,22]. No degradation of TPC–Ahx–ATWLPPR could be observed in tumor and plasma up to 2 h following intravenous injection, whereas most peptides do not circulate in the blood for more than few minutes because of degradation by peptidases [43]. The photosensitizer at the amino-terminus of the peptide could temporarily protect it from enzymatic degradation.

Our results demonstrate that TPC–Ahx–ATWLPPR, which binds to NRP-1 but is devoid of affinity for KDR, is a much more potent photosensitizer than TPC in HUVEC expressing NRP-1. However, we have shown that U87 cells also expressed NRP-1 receptors. According to our in vitro results and tumor tissue levels reached in vivo, TPC–Ahx–ATWLPPR could target not only tumor endothelial cells but also tumor cells themselves. Thus, it may efficiently potentiate the vascular and direct effects of PDT in vivo.

Acknowledgements

The authors thankfully acknowledge Pr Jean-François Muller and Drs Benoît Maunit and Marc Dodeller for the MALDI–TOF mass spectrometry analysis. This work was supported by the research funds of the French “Ligue Nationale Contre le Cancer, Comités Lorrains”.

References

[1] T.J. Dougherty, C.J. Gomer, B.W. Henderson, G. Jori, D. Kessel, M. Korbelik, J. Moan, Q. Peng, Photodynamic therapy, J. Natl. Cancer Inst. 90 (12) (1998) 889–905.

[2] W.M. Sharman, J.E. van Lier, C.M. Allen, Targeted photodynamic therapy via receptor mediated delivery systems, Adv. Drug Deliv. Rev. 56 (1) (2004) 53–76.

[3] R. Schneider, F. Schmitt, C. Frochot, Y. Fort, N. Lourette, F. Guillemin, J. F. Muller, M. Barberi Heyob, Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy, Bioorg. Med. Chem. 13 (8) (2005) 2799–2808.

[4] J. Folkman, Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease, Nat. Med. 1 (1) (1995) 27–31.

[5] K. Ichikawa, T. Hikita, N. Maeda, S. Yonezawa, Y. Takeuchi, T. Asai, Y. Namba, N. Oku, Antiangiogenic photodynamic therapy (PDT) by using long circulating liposomes modified with peptide specific to angiogenic vessels, Biochim. Biophys. Acta 1669 (1) (2005) 69–74.

[6] N. Ferrara, Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress, Endocr. Rev. 25 (4) (2004) 581–611.

[7] S.I. Ishigami, S. Arii, M. Furutani, M. Niwano, T. Harada, M. Mizumoto, A. Mori, H. Onodera, M. Imamura, Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer, Br. J. Cancer 78 (10) (1998) 1379–1384.

[8] H. Bando, H.A. Weich, M. Brokelmann, S. Horiguchi, N. Funata, T. Ogawa, M. Toi, Association between intratumoral free and total VEGF, soluble VEGFR 1, VEGFR 2 and prognosis in breast cancer, Br. J. Cancer 92 (3) (2005) 553–561.

[9] G. Neufeld, T. Cohen, S. Gengrinovitch, Z. Poltorak, Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, FASEB J. 13 (1) (1999) 9–22.

[10] S. Soker, S. Takashima, H.Q. Miao, G. Neufeld, M. Klagsbrun, Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor, Cell 92 (6) (1998) 735–745.

[11] G.B. Whitaker, B.J. Limberg, J.S. Rosenbaum, Vascular endothelial growth factor receptor-2 and neuropilin-1 form a receptor complex that is responsible for the differential signaling potency of VEGF(165) and VEGF (121), J. Biol. Chem. 276 (27) (2001) 25520–25531.

[12] S. Soker, H.Q. Miao, M. Nomi, S. Takashima, M. Klagsbrun, $VEGF_{165}$ mediates formation of complexes containing VEGFR-2 and neuropilin-1 that enhance $VEGF_{165}$-receptor binding, J. Cell. Biochem. 85 (2) (2002) 357–368.

[13] H.Q. Miao, P. Lee, H. Lin, S. Soker, M. Klagsbrun, Neuropilin-1 expression by tumor cells promotes tumor angiogenesis and progression, FASEB J. 14 (15) (2000) 2532–2539.

[14] R. Binetruy-Tournaire, C. Demangel, B. Malavaud, R. Vassy, S. Rouyre, M. Kraemer, J. Plouet, C. Derbin, G. Perret, J.C. Mazie, Identification of a peptide blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis, EMBO J. 19 (7) (2000) 1525–1533.

[15] G.Y. Perret, A. Starzec, N. Hauet, J. Vergote, M. Le Pecheur, R. Vassy, G. Leger, K.A. Verbeke, G. Bormans, P. Nicolas, A.M. Verbruggen, J.L. Moretti, In vitro evaluation and biodistribution of a 99 mTc-labeled anti-VEGF peptide targeting neuropilin-1, Nucl. Med. Biol. 31 (5) (2004) 575–581.

[16] J. Neimark, J.P. Briand, Development of a fully automated multichannel peptide synthesizer with integrated TFA cleavage capability, Pept. Res. 6 (4) (1993) 219–228.

[17] B. Di Stasio, C. Frochot, D. Dumas, P. Even, J. Zwier, A. Muller, J. Didelon, F. Guillemin, M.L. Viriot, M. Barberi-Heyob, The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin, Eur. J. Med. Chem. (2005).

[18] S. Pinel, M. Barberi-Heyob, E. Cohen-Jonathan, J.L. Merlin, C. Delmas, F. Plenat, P. Chastagner, Erythropoietin-induced reduction of hypoxia before and during fractionated irradiation contributes to improvement of radio-response in human glioma xenografts, Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 59 (1) (2004) 250–259.

[19] T.C. Chou, P. Talalay, Quantitative analysis of dose–effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, Adv. Enzyme Regul. 22 (1984) 27–55.

[20] M. Barberi-Heyob, H. Rezzoug, J.L. Merlin, F. Guillemin, Sensitive isocratic liquid chromatographic assay for the determination of 5,10,15,20-tetra(*m*-hydroxyphenyl)chlorin in plasma and tissue with electrochemical detection, J. Chromatogr., B, Biomed. Sci. Appl. 688 (2) (1997) 331–338.

[21] P. Cramers, M. Ruevekamp, H. Oppelaar, O. Dalesio, P. Baas, F.A. Stewart, Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy, Br. J. Cancer 88 (2) (2003) 283–290.

[22] H.J. Jones, D.I. Vernon, S.B. Brown, Photodynamic therapy effect of *m*-THPC (Foscan) in vivo: correlation with pharmacokinetics, Br. J. Cancer 89 (2) (2003) 398–404.

[23] R. Tournaire, C. Demangel, C. Derbin, G. Perret, J.-C. Mazie, J. Plouet, R. Vassy, Peptides blocking vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis polynucleotides encoding said peptides and methods of use thereof. WO-01/72829 (2001).

[24] V.H. Fingar, P.K. Kik, P.S. Haydon, P.B. Cerrito, M. Tseng, E. Abang, T.J. Wieman, Analysis of acute vascular damage after photodynamic therapy using benzoporphyrin derivative (BPD), Br. J. Cancer 79 (11–12) (1999) 1702–1708.

[25] B. Chen, Y. Xu, T. Roskams, E. Delaey, P. Agostinis, J.R. Vandenheede, P. de Witte, Efficacy of antitumoral photodynamic therapy with hypericin: relationship between biodistribution and photodynamic effects in the RIF-1 mouse tumor model, Int. J. Cancer 93 (2) (2001) 275–282.

[26] F. Borle, A. Radu, C. Fontolliet, H. van den Bergh, P. Monnier, G. Wagnieres, Selectivity of the photosensitiser Tookad for photodynamic therapy evaluated in the Syrian golden hamster cheek pouch tumour model, Br. J. Cancer 89 (12) (2003) 2320–2326.

[27] K. Kurohane, A. Tominaga, K. Sato, J.R. North, Y. Namba, N. Oku, Photodynamic therapy targeted to tumor-induced angiogenic vessels, Cancer Lett. 167 (1) (2001) 49–56.
[28] M.E. Eichhorn, S. Strieth, M. Dellian, Anti-vascular tumor therapy: recent advances, pitfalls and clinical perspectives, Drug Resist. Updat. 7 (2) (2004) 125–138.
[29] P.E. Thorpe, D.J. Chaplin, D.C. Blakey, The first international conference on vascular targeting: meeting overview, Cancer Res. 63 (5) (2003) 1144–1147.
[30] I. Zachary, Signaling mechanisms mediating vascular protective actions of vascular endothelial growth factor, Am. J. Physiol., Cell Physiol. 280 (6) (2001) C1375–C1386.
[31] H. Oh, H. Takagi, A. Otani, S. Koyama, S. Kemmochi, A. Uemura, Y. Honda, Selective induction of neuropilin-1 by vascular endothelial growth factor (VEGF): a mechanism contributing to VEGF-induced angiogenesis, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 99 (1) (2002) 383–388.
[32] A.P. Janssen, R.M. Schiffelers, T.L. ten Hagen, G.A. Koning, A.J. Schraa, R.J. Kok, G. Storm, G. Molema, Peptide-targeted PEG-liposomes in anti-angiogenic therapy, Int. J. Pharm. 254 (1) (2003) 55–58.
[33] R.Z. Renno, Y. Terada, M.J. Haddadin, N.A. Michaud, E.S. Gragoudas, J. W. Miller, Selective photodynamic therapy by targeted verteporfin delivery to experimental choroidal neovascularization mediated by a homing peptide to vascular endothelial growth factor receptor-2, Arch. Ophthalmol. 122 (7) (2004) 1002–1011.
[34] S. Rodrigues, E. Van Aken, S. Van Bocxlaer, S. Attoub, Q.D. Nguyen, E. Bruyneel, B.R. Westley, F.E. May, L. Thim, M. Mareel, C. Gespach, S. Emami, Trefoil peptides as proangiogenic factors in vivo and in vitro: implication of cyclooxygenase-2 and EGF receptor signaling, FASEB J. 17 (1) (2003) 7–16.
[35] F. Ye, H.Z. Chen, X. Xie, D.F. Ye, W.G. Lu, Z.M. Ding, Vascular endothelial growth factor (VEGF) and ovarian carcinoma cell supernatant activate signal transducers and activators of transcription (STATs) via VEGF receptor-2 (KDR) in human hemopoietic progenitor cells, Gynecol. Oncol. 94 (1) (2004) 125–133.
[36] M.P. Barr, A.M. Byrne, A.M. Duffy, C.M. Condron, M. Devocelle, P. Harriott, D.J. Bouchier-Hayes, J.H. Harmey, A peptide corresponding to the neuropilin-1-binding site on VEGF(165) induces apoptosis of neuropilin-1-expressing breast tumour cells, Br. J. Cancer (2005).
[37] G. Kostenich, N. Livnah, T.A. Bonasera, T. Yechezkel, Y. Salitra, P. Litman, S. Kimel, A. Orenstein, Targeting small-cell lung cancer with novel fluorescent analogs of somatostatin, Lung Cancer (2005).
[38] A. Engel, S.K. Chatterjee, A. Al-Arifi, P. Nuhn, Influence of spacer length on the agglutination of glycolipid-incorporated liposomes by ConA as model membrane, J. Pharm. Sci. 92 (11) (2003) 2229–2235.
[39] I. Rosenthal, Phthalocyanines as photodynamic sensitizers, Photochem. Photobiol. 53 (6) (1991) 859–870.
[40] A. Eberhard, S. Kahlert, V. Goede, B. Hemmerlein, K.H. Plate, H.G. Augustin, Heterogeneity of angiogenesis and blood vessel maturation in human tumors: implications for antiangiogenic tumor therapies, Cancer Res. 60 (5) (2000) 1388–1393.
[41] H.G. Augustin, Antiangiogenic tumour therapy: will it work? Trends Pharmacol. Sci. 19 (6) (1998) 216–222.
[42] H. Ding, X. Wu, L. Roncari, N. Lau, P. Shannon, A. Nagy, A. Guha, Expression and regulation of neuropilin-1 in human astrocytomas, Int. J. Cancer 88 (4) (2000) 584–592.
[43] C. Adessi, C. Soto, Converting a peptide into a drug: strategies to improve stability and bioavailability, Curr. Med. Chem. 9 (9) (2002) 963–978.

II. "Response surface methodology : an extensive potential to optimize *in vivo* photodynamic therapy conditions"

RESPONSE SURFACE METHODOLOGY: AN EXTENSIVE POTENTIAL TO OPTIMIZE *IN VIVO* PHOTODYNAMIC THERAPY CONDITIONS

LORAINE TIRAND, PH.D.[*], THIERRY BASTOGNE, PH.D.[*,§], DENISE BECHET, M.SC.[*], MICHEL LINDER, PH.D.[†], NOÉMIE THOMAS, PH.D.[*], CÉLINE FROCHOT, PH.D.[‡,§],

FRANÇOIS GUILLEMIN, M.D., PH.D.[*,§] AND MURIEL BARBERI-HEYOB, PH.D.[*,§]

[*]Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), Nancy-University, CNRS, Centre Alexis Vautrin (CAV), Vandœuvre-lès-Nancy, France ;[†]Laboratoire de Sciences et Génie Alimentaires (LSGA), Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires-Institut National Polytechnique de Lorraine (ENSAIA-INPL), Nancy-University, Vandœuvre-lès-Nancy; [‡] Département de Chimie Physique de Réactions (DCPR), Nancy-University, CNRS, Nancy, France ; [§]GDR 3049 "Médicaments Photoactivables - Photochimiothérapie (PHOTOMED)"

There is no conflict of interest.
Words: 4939

Address correspondence to:
Dr. Muriel Barberi-Heyob
Centre Alexis Vautrin, Laboratoire CRAN,
Avenue de Bourgogne, Brabois,
F-54511 Vandœuvre-lès-Nancy, France
Telephone: +33 3 83 59 83 76
m.barberi@nancy.fnclcc.fr

Abstract

Purpose: Photodynamic Therapy (PDT) is based on the interaction of a photosensitizing agent (PS), light and oxygen. Few new PS are being developed up to the *in vivo* stage, partly because of the difficulty to find right treatment conditions. Response surface methodology (RSM), an empirical modeling approach based on data resulting from a set of designed experiments, was suggested as a rational solution to select *in vivo* PDT conditions with a new peptide-conjugated PS targeting neuropilin-1.

Methods and Materials: A Doehlert experimental design was selected to model effects and interactions of PS dose, fluence and fluence rate on the growth of U87 human malignant glioma cells xenografted in nude mice using a fixed drug-light interval. All experimental results were computed by the Nemrod-W® software and Matlab®.

Results: Intrinsic diameter growth rate, a tumor growth parameter independent of the initial volume of the tumor, was selected as response variable and compared to tumor growth delay and relative tumor volumes. With only 13 experimental conditions tested, an optimal PDT condition was selected (PS dose: 2.80 mg/kg; fluence: 120 J/cm^2; fluence rate: 85 mW/cm^2). Treatment of glioma-bearing mice with the peptide-conjugated PS followed by the optimized PDT condition showed a statistically significant improvement in tumor growth compared with animals who received this PDT with the non-conjugated PS.

Conclusions: RSM appears to be a useful experimental approach for rapid testing of different treatment conditions and determination of optimal values of PDT factors for any PS.

Photodynamic Therapy, *in vivo*, Dosimetry, Response Surface Methodology, Doehlert experimental design

INTRODUCTION

Photodynamic Therapy (PDT) is an innovative modality for the treatment of localized tumors (1), involving a photosensitizer (PS), light and molecular oxygen. First, the PS accumulates in cells with elevated metabolism, such as cancer cells. Then, light is locally applied at a PS-specific wavelength, which induces the formation of short-lived oxygen-derived species, including highly cytotoxic singlet oxygen ($^1O_2$). Destruction of the neovasculature of tumors by PDT is thought to play a major part in the destruction of some vascularized tumors. In order to potentiate the anti-vascular effect of PDT, receptors specifically located on angiogenic endothelial cells, such as receptors to Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), can be used as molecular targets. We have previously described the conjugation of a PS (5-(4-carboxyphenyl)-10,15,20-triphenyl-chlorin, TPC), *via* a spacer (6-aminohexanoic acid, Ahx), to an heptapeptide (ATWLPPR), specific for the VEGF receptor neuropilin-1 (NRP-1). This new targeted PS (TPC-Ahx-ATWLPPR) proved to be very efficient *in vitro* in human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), compared to its non-conjugated counterpart TPC, requiring subsequent *in vivo* testing (2). The first question to be addressed, when a new PS has to be evaluated *in vivo*, is the determination of the optimal PDT dosimetry. *In vitro* PDT conditions cannot be transposed *in vivo*.

The notion of PDT dosimetry exists in a variety of definitions. Four categories are usually considered (3, 4): direct dosimetry, implicit dosimetry, biophysical/biological tissue response monitoring and explicit dosimetry. From a practical clinical point of view, direct dosimetry (also known as light dosimetry) is currently the most widely used technique. It relies on a macroscopic biophysical law (5). Therefore, determining optimal modalities of PDT from this physical model could be efficient if in practice, parameters were known, measurable and constant. However, space-time variations in the parameters can occur during the photodynamic treatment. Light dosimetry does not take into account numerous *phenomena*, regarding one or several of the three main factors involved (*i.e.* PS, light and oxygen):

(1) PS concentration within the tumor displays spatial heterogeneity (*i.e.* center *vs* periphery, vasculature *vs* tumor cells) (6). Because of the short lifetime of reactive oxygen species (ROS), the PS intracellular localization at the onset of light irradiation and its possible relocalization during treatment can impact on PDT outcome (7);

(2) light penetration through tissues depends on their specific optical properties (8);

(3) molecular oxygen concentration is heterogeneous within the tumor, due to differences in vascularization and oxygen supply (6);

(4) to complicate matters further, all these factors can vary during treatment (*e.g.* photobleaching of the PS (9), variations of tissue optical properties (10) and of molecular

oxygen concentrations, due to photochemical consumption during treatment and/or vascular damage) (11);

(5) the optimal PDT dose required is dependent on the cancer type and the intrinsic sensitivity of targeted cells.

These difficulties make the determination of the PDT modalities a nonlinear and multivariate optimization problem, and a successful dosimetry strategy has to take into consideration these particular aspects of the problem. In practice, the four factors usually considered are: the administered PS dose, the time interval between PS administration and light irradiation (drug-light interval, DLI), light fluence and light fluence rate (12). In our approach, to limit the number of experiments to be carried out, a DLI of 4h was selected, corresponding to relevant PS levels in plasma and tumor, low PS levels in skin and low degradation of the peptidic moiety (13, 14). Fixing this parameter, the determination of the optimal PDT dosimetry can be expressed as the optimal choice of the three remaining factors (PS dose, light fluence and fluence rate), *i.e.* selection of values leading to an optimal PDT response. A first method would be to test all the factors combinations (full factorial design analysis), which would require a large number of animals and be very time-consuming (15). Another method would be a step-by-step approach, wherein each factor is varied while the other ones are fixed to an arbitrary value. Nevertheless, because of the interactions between factors, this method would provide biased results.

Response surface methodology (RSM) can be defined as a statistical method that uses quantitative data from designed experiments to infer a multivariate model. In statistics, RSM explores the relationships between several explanatory variables (input variables or factors) and one or more response variables (output variable). Box and Wilson suggested polynomial models (linear, quadratic with and without cross terms, cubic, *etc.*) suitable for the purpose (16). This description is an approximation, but such a model is easy to estimate and apply, even when little is known about the phenomenon to be modelled. RSM is particularly used for optimization purposes (17) and has already been successfully applied in various fields for instance, in the combination therapy of cancer (18), but never in the field of PDT. The use of RSM appears to be well suited to the empirical model-building of the *in vivo* PDT response, allowing all factors to be varied simultaneously, while using a minimal number of animals. Accordingly, the assessment of the RSM technique as an alternative and empirical approach to optimize *in vivo* PDT conditions with a newly-developed PS was investigated.

METHODS AND MATERIALS

Animals and tumor model

Female athymic Foxn1 nude mice (*nu/nu*) were used for this study (Harlan, Gannat, France). Animal care and studies were performed according to the European convention for the protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, EU directives and The Law on Statute on Animal Experiments in France. Mice (6-7/cage) were maintained in standard cages in isolators. Animals were housed with 12-hour light/dark cycle at 22-24°C and 50% humidity, and they were administered with food and water *ad libitum*. The mice were used for tumor implantation when they were 7-9 weeks old (20-25 g). They were anesthetized using an intraperitoneal injection of a mixture of ketamine (Ketalar®, Panpharma, Fougères, France) and xylazine (Rompun®, Bayer Pharma, Puteaux, France) at a dose of 60 mg/kg and 8 mg/kg, respectively. The model of human malignant glioma was obtained using U87 cells (19). Tumors were treated when they reached a treatment size of 5±1 mm geometric mean diameter (15±5 days after tumor grafting).

Photosensitizers

TPC was purchased from Frontier Scientific (Logan, UT). TPC-Ahx-ATWLPPR was synthesized and purified (2, 14). Stock solutions in dimethylsulfoxide (2 mM) were used. The PS were diluted in polyethylene glycol (PEG) 400/ethanol/water (30:20:50, v/v/v) to the concentration required for intravenous (i.v) injection to mice (200 µL/25 g body weight). Concentrations were checked using a Perkin-Elmer UV-visible spectrophotometer (Lambda 2, Courtaboeuf, France), using the molar extinction coefficients reported previously (2).

PDT treatment of tumors

For the optimization of PDT conditions, TPC-Ahx-ATWLPPR, at the dose indicated by the experimental matrix was injected to the mice *via* the tail vein. Irradiation of tumors was carried out at 652 nm, using a dye laser (Spectra-Physics 375B, Les Ulis, France), pumped with an argon laser (Spectra-Physics 2020). Light was delivered through an optical fiber (HCG type, SEDI Fibres Optiques, Courcouronnes, France), and a light distributor (Frontal Diffuser FDI, Medlight SA, Ecublens, Switzerland) for a perfectly homogeneous illumination of the spot and illuminated the tumor surface over a 1-cm diameter beam spot. The incident fluence rate on the tumors was evaluated using an optical power meter (SP407, SpectraPhysics). Following PDT, tumor volume (V) was calculated using the *formula*:

$$V = (length \times width^2)/2 \quad (1)$$

Measurements were carried out during 2 months, or until tumors reached a size of 1 cm^3, at which time mice were sacrificed by cervical dislocation.

In vivo PDT response variables

Two commonly used characteristics of tumor growth are the tumor growth delay (TGD) and the tumor volume T/C value. TGD was calculated from the following interpolation *formula*:

$$TGD = t_1 + (t_2 - t_1)\ln(V_e/V_1)/\ln(V_2/V_1) \quad (2)$$

where t_x is the interpolated day, t_1 is the lower observation day bracketing the event, t_2 is the upper observation day bracketing the event, V_1 is the tumor volume on Day t_1, V_2 is the tumor volume on day t_2, and V_e is the event threshold defined as a quadrupling of tumor volume from the initial tumor volume. Relative tumor volumes ($V(day)/V_0$) for control (C) and treated (T) mice were calculated at days 7, 10, 14, 17 and 21 after PDT. T/C value corresponds to the median relative tumor volumes for the treated group divided by the median relative tumor volumes for the control group. TGD and T/C response variables only give quantitative information about the tumor growth at an event point but provide no information about the global behavior of the tumor before or after this event. A third statistical parameter entitled diameter growth rate (DGR) was suggested in relation with the diameter *D* of a fictitious spherical tumor whose volume *V* is identical to that of the tumor. The tumor volume *V* is estimated from equation (1), and the spherical diameter *D* is obtained by:

$$D = \sqrt[3]{\frac{6V}{\pi}} \quad (3)$$

TGD, T/C and DGR were estimated using Matlab®.

Experimental Design

The three factors investigated were fluence rate, fluence and PS dose, noted x_1, x_2 and x_3 respectively. Limits of the experimental domain to be explored were defined as follows: $x_1 \in$ [50-150] mW/cm^2, $x_2 \in$ [10-150] J/cm^2 and $x_3 \in$ [0.70 - 2.80] mg/kg (0.44 - 1.75 µmol/kg). PS doses were chosen in a range commonly used with other PS (15, 12). Preliminary *in vivo* experiments for pharmacokinetic analyses showed an absence of toxicity in the dark at these doses (13, 2). The ranges of fluence and fluence rate values were also chosen according to the literature (20). The seven studied responses were TGD, T/C_7, T/C_{10}, T/C_{14}, T/C_{17}, T/C_{21} and IDGR (details in *Results*).

For three (k) input variables (fluence rate, fluence and PS dose), a Doehlert design requires a minimum set of 13 experiments ($N \geq k^2 + k + 1$) and the experimental points are uniformly distributed within the three-dimensional space of coded variables. Thus, 12 experiments are equidistant from a central experiment (Fig. 1). Dimensionless centered variables were used. The natural unit and the reduced centered variables are noted x_i and X_i, respectively. The 13 treatment conditions were tested in random order and each condition presented in Table 1 was applied to five mice. For this Doehlert design structure x_1, x_2 and x_3 were sampled into 5, 7 and 3 levels (discrete values), respectively.

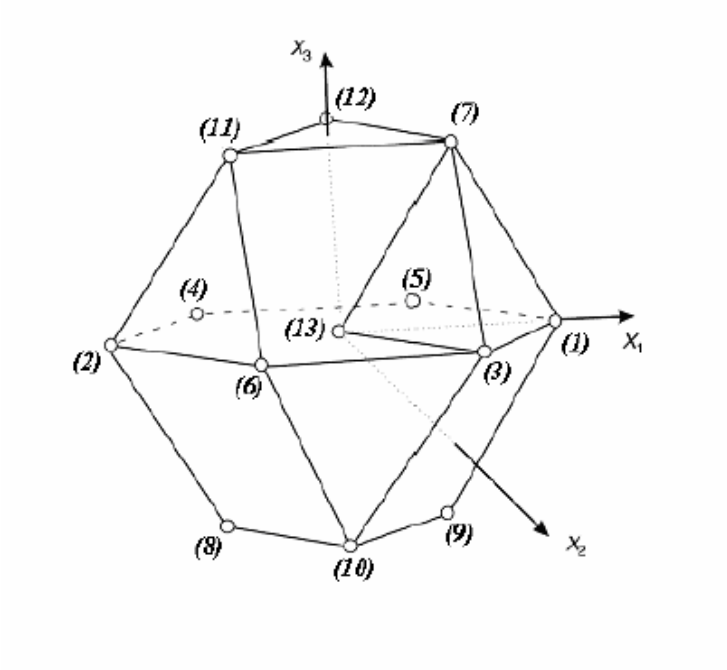


Figure 1: Cuboctahedron exhibiting the location of the 13 experimental points for three different coded factors (*i.e.* X_1, X_2 and X_3) in a Doehlert experimental design. Along the X_3 axis, in a medium slice (X_3=0), six experiments are located at the vertices (1, 2, 3, 4, 5 and 6) and one at the center (13) of a hexagon ; moreover, three experiments (7, 11 and 12) are in an upper slice and three other experiments (8, 9 and 10) in a lower slice. Experiments 1 to 12 are each located at the same distance from the center of the experimental domain.

Response Surface Model

A quadratic model structure with 10 coefficients was assumed to describe relationships between the response (Y) and the coded factors studied (X_1, X_2 and X_3),

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^{3} b_i X_i + \sum_{i=1}^{3} b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{2} \sum_{j=i+1}^{3} b_{ij} X_i X_j , \qquad (4)$$

where b_0 is the constant coefficient (average response), b_i are the coefficients of the linear terms, b_{ii} are the coefficients of the quadratic terms, and b_{ij} is the coefficient of the interaction between X_i and X_j. Y denotes either TGD, T/C_7, T/C_{10}, T/C_{14}, T/C_{17}, T/C_{21} or IDGR. The model coefficients

were estimated by a multiple regression analysis based on a least square estimation technique implemented into the NEMROD-W® software (LPRAI, Marseille, France).

PDT optimization and statistical analysis

Selection of optimal PDT modalities was carried by a desirability function designed in Nemrod®, taking into account both the IDGR minimization and the TGD maximization. Efficacy of PDT treatment modalities, selected from RSM analysis, was presented according to the Kaplan-Meier model, considering the percentage of tumors not having reached 5 and 10 times their initial volume as the end-point. Statistical analysis was conducted through the log-rank test.

RESULTS

Diameter versus volume

Intrinsic diameter growth rate (IDGR), a new tumor growth statistics, was suggested as response variable. Using the volume-equivalent diameter *D* as Y-axis, the PDT responses to 13 designed experimental conditions (Table 1) exhibited a linear trend after a transient period (about 8 days) (Fig. 2). This steady-state behavior is corroborated by a biophysical modeling study presented by Galle *et al.* (21), which was described by:

$$\hat{D} = a(t - \tau) \qquad (5)$$

where $\hat{D}$ is the diameter predicted value provided by the model, the slope a corresponds to the tumor DGR (mm/day) and τ is analog to a growth delay. This linear feature of the diameter response was absent in the volume curves and therefore makes the diameter growth kinetics more intelligible than the volume growth kinetics. Contrary to TGD and T/C statistics, the DGR values were not calculated at a given time point but determined by a linear regression. To reduce the impact of initial conditions on the variability of the DGR values, an IDGR variable was suggested and defined by:

$$IDGR = \frac{a}{D_0} \qquad (6)$$

Where D_0 is the spherical equivalent diameter at the time of treatment

IDGR coefficient of variation (0.049) was widely reduced compared to DGR (0.42) for the control group, showing that IDGR was much less sensitive to the uncontrolled variations of the initial tumor volume between the mice used in the experiments.

Table 1. Experimental matrix for the three factors, fluence rate, fluence and PS dose (x_1, x_2 and x_3, respectively) according to the Doehlert uniform shell design, and median values of the responses TGD, T/C_7, T/C_{10}, T/C_{14}, T/C_{17}, T/C_{21}, and IDGR. For each tumor growth parameter, the median value was calculated from individual responses of five mice.

	Experimental values			Responses (tumor growth parameters)						
Exp.	**x_1 (mW/cm^2)**	**x_2 (J/cm^2)**	**x_3 (mg/kg)**	**TGD***	**T/C_7**	**T/C_{10}**	**T/C_{14}**	**T/C_{17}**	**T/C_{21}**	**IDGR**
1	150	80	1.75	1.082	0.811	0.761	0.927	1.138	1.121	0.251
2	50	80	1.75	1.496	0.763	0.619	0.607	0.648	0.623	0.231
3	125	150	1.75	1.634	0.465	0.538	0.733	0.957	0.665	0.228
4	75	10	1.75	1.619	0.674	0.634	0.547	0.733	0.611	0.226
5	125	10	1.75	0.835	1.090	1.025	1.176	1.315	0.993	0.252
6	75	150	1.75	1.743	0.631	0.485	0.465	0.536	0.411	0.242
7	125	103	2.80	1.433	0.468	0.419	0.453	0.571	0.482	0.253
8	75	57	0.70	1.082	0.930	0.842	1.073	1.183	1.150	0.247
9	125	57	0.70	1.227	0.719	0.712	0.668	0.810	0.701	0.233
10	100	127	0.70	1.261	0.805	0.724	0.663	0.839	0.778	0.249
11	75	103	2.80	2.075	0.520	0.378	0.387	0.403	0.330	0.220
12	100	33	2.80	1.074	0.941	0.916	0.984	1.133	0.907	0.264
13	100	80	1.75	0.913	1.097	0.997	1.117	1.459	1.282	0.266

* TGD, tumor growth delay; T/C, relative tumor volumes for control (C) and treated (T) mice at days 7 (T/C_7), 10 (T/C_{10}), 14 (T/C_{14}), 17(T/C_{14}) and 21 (T/C_{21}) after PDT; IDGR, intrinsic diameter growth rate

Validation of the experimental matrix

We checked that the irradiation times imposed by the matrix of experiments were adapted to experimental constraints (mostly, time length of anesthesia). In preliminary experiments, mice were treated according to some of the strongest (*i.e.* with respect to the product of PS dose and light fluence, from the simplified *formula* of photodynamic dose (22) conditions of the matrix (*i.e.* n°6, 7 and 11). These conditions did not induce any weight loss over 10%, following treatment, which validates that all conditions of the matrix should be non-toxic.

Single and combined effects of fluence rate, fluence and PS dose on tumor growth

Median values of the seven examined responses obtained for each condition are presented in Table 1. Values of b_1, b_2, b_3, b_{11}, b_{22} and b_{33} estimate the linear and nonlinear effects, respectively, of the three coded factors (fluence rate, fluence and PS concentration) while b_{12}, b_{13} and b_{23} estimate effects of their second order interactions on the response variables (Table 2). The coefficient of determination points out that the IDGR model is the best one in terms of goodness-of-fit (R^2=0.975). If the TGD model is also statistically significant (R^2=0.958), the mean R^2 values for the five T/C statistics are too low to be considered as significant (Table 2). As a result, the IDGR and TGD response surface models were qualified for the PDT optimization phase. Optimizing PDT responses consisted in both maximizing TGD and minimizing IDGR values. This is the reason why the IDGR quadratic coefficients are mainly negative, corresponding to an inverse relationship between the considered factors and the response. On the contrary, almost all the TGD quadratic coefficients are positive (Table 2). In that case, raising each factor contributes to increase TGD.

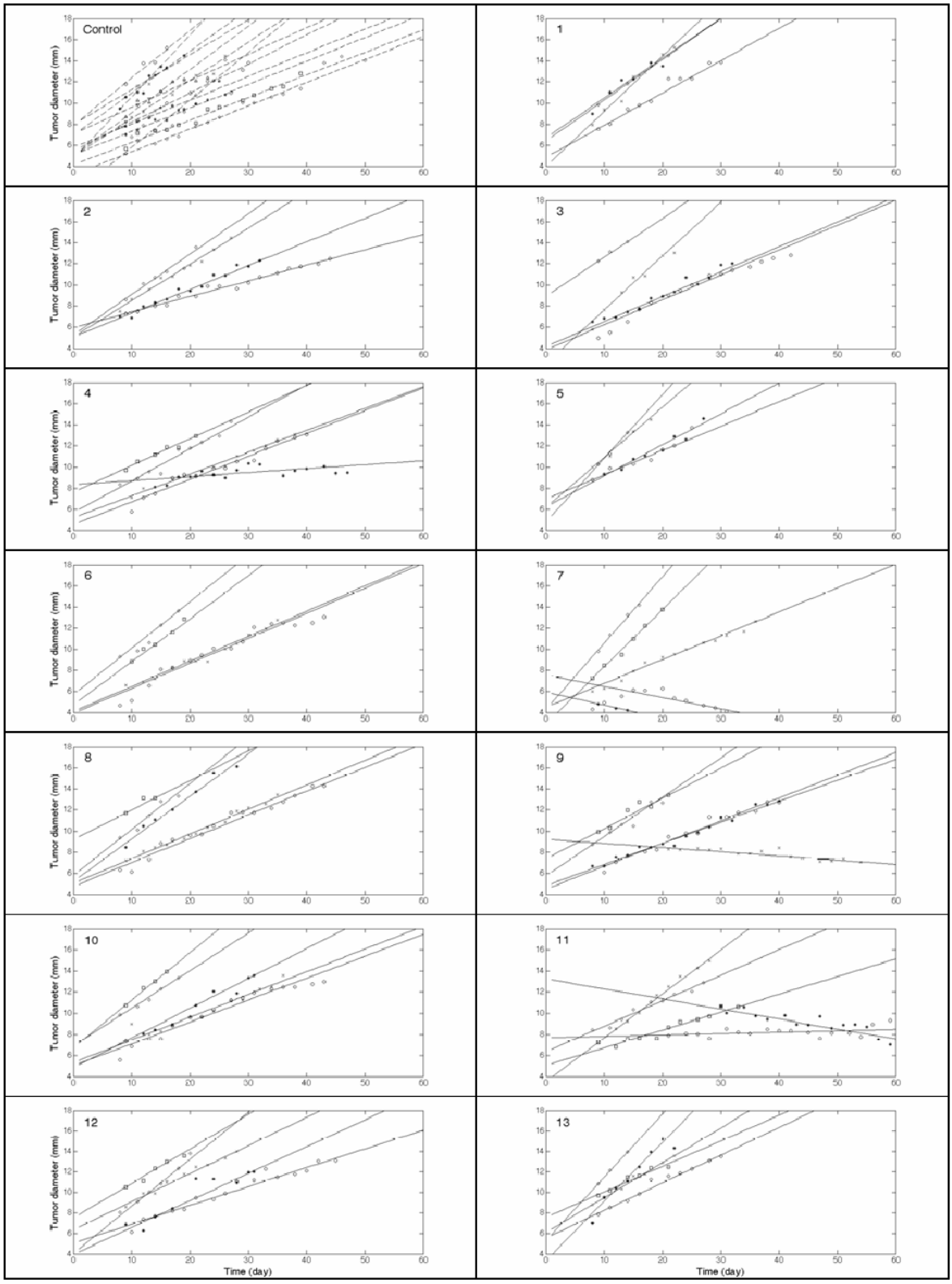


Figure 2. Linear relationships of tumor growth for non-treated mice (see under *Materials and Methods*), and mice treated by PDT according to the 13 experimental conditions of the Doehlert matrix. Each line represents an individual experimentation. The 13 treatment conditions were presented in Table 1. Five mice were used for each condition. The control group (n=13) consisted of mice that did not receive any treatment (no PS, no light).

Table 2. Model coefficients of the response surface models between the responses (TGD, T/C_7, T/C_{10}, T/C_{14}, T/C_{17}, T/C_{21} and IDGR) and the three considered factors (fluence rate, x_1; fluence, x_2; PS dose, x_3), see the *Methods and Materials* section.

Coefficient	Meaning	TGD[§]	T/C_7	T/C_{10}	T/C_{14}	T/C_{17}	T/C_{21}	IDGR
b_0	Constant coefficient (average response, at the center of the experimental domain)	0.913 **	1.097 **	0.997 **	1.117 *	1.459 *	1.282 *	0.266 ***
b_1	Linear coefficient related to the impact of fluence rate on the response	-0.277 *	0.01	0.080	0.150	0.222	0.167	0.009 *
b_2	Linear coefficient related to the impact of fluence on the response	0.313 *	-0.212 *	-0.220 *	-0.225	-0.236	-0.208	-0.004
b_3	Linear coefficient related to the impact of PS dose on the response	0.207	-0.107	-0.115	-0.118	-0.148	-0.186	0.002
b_{11}	Quadratic coefficient related to fluence rate	0.376	-0.310	-0.307	-0.350	-0.566	-0.410	-0.025 *
b_{22}	Quadratic coefficient related to fluence	0.601 *	-0.406	-0.333	-0.399	-0.576	-0.679	-0.030 *
b_{33}	Quadratic coefficient related to PS dose	0.424	-0.371	-0.338	-0.431	-0.668	-0.564	-0.019 *
b_{12}	Interaction coefficient between fluence rate and fluence	0.390	-0.336	-0.195	-0.208	-0.093	-0.074	-0.023 *
b_{13}	Interaction coefficient between fluence rate and PS dose	-0.620 *	0.216	0.174	0.362	0.364	0.394	0.037 **
b_{23}	Interaction coefficient between fluence and PS dose	0.485	-0.337	-0.338	-0.269	-0.349	-0.345	-0.028 *
R^2	**Coefficient of determination**	0.958	0.930	0.903	0.710	0.800	0.838	**0.975**

[§] TGD, tumor growth delay; T/C, relative tumor volumes for control (C) and treated (T) mice at days 7 (T/C_7), 10 (T/C_{10}), 14 (T/C_{14}), 17(T/C_{14}) and 21 (T/C_{21}) after PDT; IDGR, intrinsic diameter growth rate. The significance of the coefficients was evaluated by multiple regression analysis based upon the F-test with unequal variance (*P < 0.05, **P < 0.01 and ***P < 0.001).

Another systematic feature concerned the influence of the interaction between fluence rate and PS dose. Its coefficient (b_{13}) was always of opposite sign to the two other interaction coefficients (Table 2). Minimizing IDGR required for the term $b_{13}.(X_1 \cdot X_3)$ to be negative, and therefore, since b_{13} was positive, that $(X_1 \cdot X_3)$ was negative, *i.e.* either $(X_1 > 0, X_3 < 0)$ or $(X_1 < 0, X_3 > 0)$,where X_1 and X_3 denote the coded variables (reduced and centered) associated with the fluence rate and PS dose, respectively. In other terms, minimizing IDGR (or T/C), as well as maximizing TGD, required to select either a low fluence rate associated with a high PS dose or conversely.

The interaction coefficient between fluence and PS dose (b_{23}) was also always greater than the one (b_{12}) associated with the interaction between fluence and fluence rate (Table 2), showing that the fluence level (X_2) and PS dose (X_3) should be positively correlated; a low fluence (*i.e.* a short therapeutic exposure time) for a low PS dose and *vice versa*. Hence, it is suggested to select a fluence level in correspondence with the PS dose.

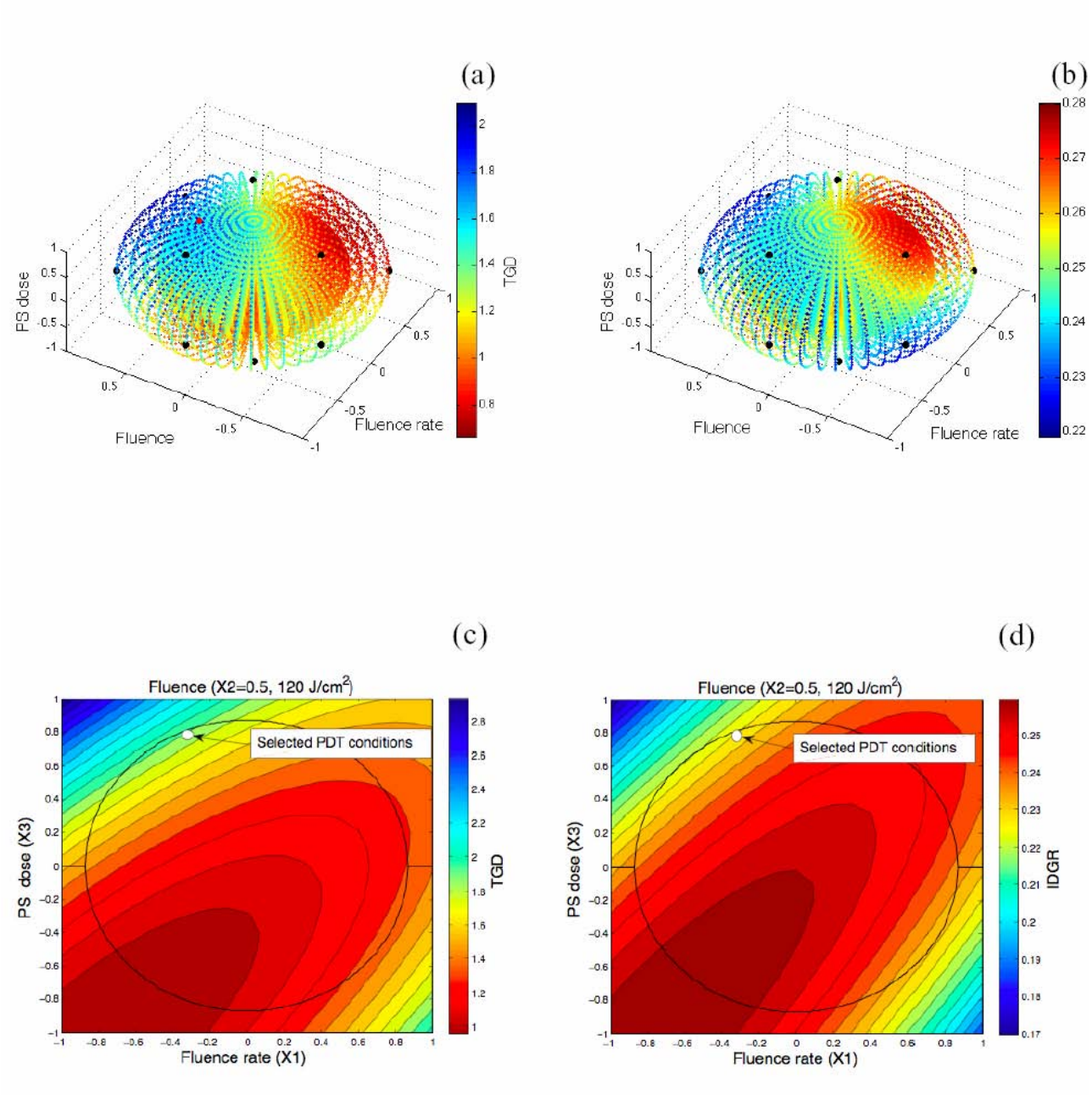


Figure 3. Three-D surface plots of (a) the TGD and (b) the IDGR response surfaces using RSM according to the three coded factors studied (PS dose, fluence rate and fluence). Blue areas illustrate possible directions for the minimization of the IDGR or the maximization of the TGD. Black dots illustrate the 13 experimental conditions of the matrix (some of them are not visible), according to the TGD responses, red one corresponding to its maximization. Contour plots of the (c) TGD and (d) IDGR responses for a fluence variable fixed at x_2=120 J/cm^2. They describe the influence of fluence rate (X_1) and PS concentration (X_3) on the minimization of TGD (c) and maximization of IDGR (d).

Optimization of PDT dosimetry

PDT optimal conditions are related to the minimization of the IDGR statistics and maximization of the TGD values. Concerning TGD, only one response area corresponding to its maximization was observed in the three dimensional (3-D) surface plot of the estimated RSM (blue zone in Fig. 3a). On the contrary, for the IDGR model, two different ways could be achieved to

optimize PDT modalities (blue zones in Fig. 3b). One of these two optimal zones is similar to the optimal area predicted by the TGD RSM, which corroborates the relevance of this result. Opposite interaction previously mentioned between fluence rate and PS dose is clearly illustrated by contour plots of the IDGR response (suggested for the TGD response), demonstrating that two directions could be retained to minimize IDGR, either a low fluence rate associated with a high PS dose or conversely (Fig. 3d). *In fine*, the suited PDT conditions were selected from the optimization of a desirability function designed in Nemrod®, taking into account both the IDGR minimization and the TGD maximization. The *in vivo* deduced PDT dosimetry was: x_1~85 mW/cm^2, x_2~120 J/cm^2 and x_3~2.80 mg/kg. This point belongs to the optimal area shared by the TGD and IDGR RSM plots (Fig. 3c, d).

PDT efficiency using optimized PDT condition

Vascular-targeted PDT conditions were optimized for TPC-Ahx-ATWLPPR to promote its vascular effect; the DLI of 4h post-intravenous injection was selected in order to take advantage of maximal intravascular concentrations of the PS (13). We have previously carried out microscopy experiments on tumor sections, in order to determine the intratumoral localization (tumor cells *vs.* endothelial cells) of TPC-Ahx-ATWLPPR after intravenous administration to human malignant-glioma bearing nude mice, in comparison with CD31-immunostained endothelial cells. The time of 4h post-injection corresponded to the highest incorporation of the conjugated PS in endothelial cells (before that time, *e.g.* at 1h post-injection, the conjugated PS was mostly localized in the plasma) (13). Using optimal PDT condition deduced from RSM, tumor growth curves following PDT with TPC-Ahx-ATWLPPR were compared to growth curves with the non conjugated PS. Conjugated PS dose was 1.75 µmol/kg both for TPC and TPC-Ahx-ATWLPPR (corresponding to 2.80 mg/kg of TPC-Ahx-ATWLPPR). Control groups (*i.e.* light only, TPC only and TPC-Ahx-ATWLPPR only) were also used; no significant differences could be observed between these groups and only the light-only control group was represented (Fig. 4). Under the PDT conditions optimized for TPC-Ahx-ATWLPPR, no significant difference could be observed between the control group and the TPC-treated group. On the contrary, mice treated by PDT with TPC-Ahx-ATWLPPR showed a statistically significant efficacy, compared to the TPC-treated group whatever the end point (Fig. 4).

The mean IDGR value calculated using achieved experimental data with the optimized PDT condition, was 0.22, *i.e.* closed to the minimal predicted value 0.21 deduced from the model. This result corroborates the relevance of the RSM model for the PDT modalities optimization.

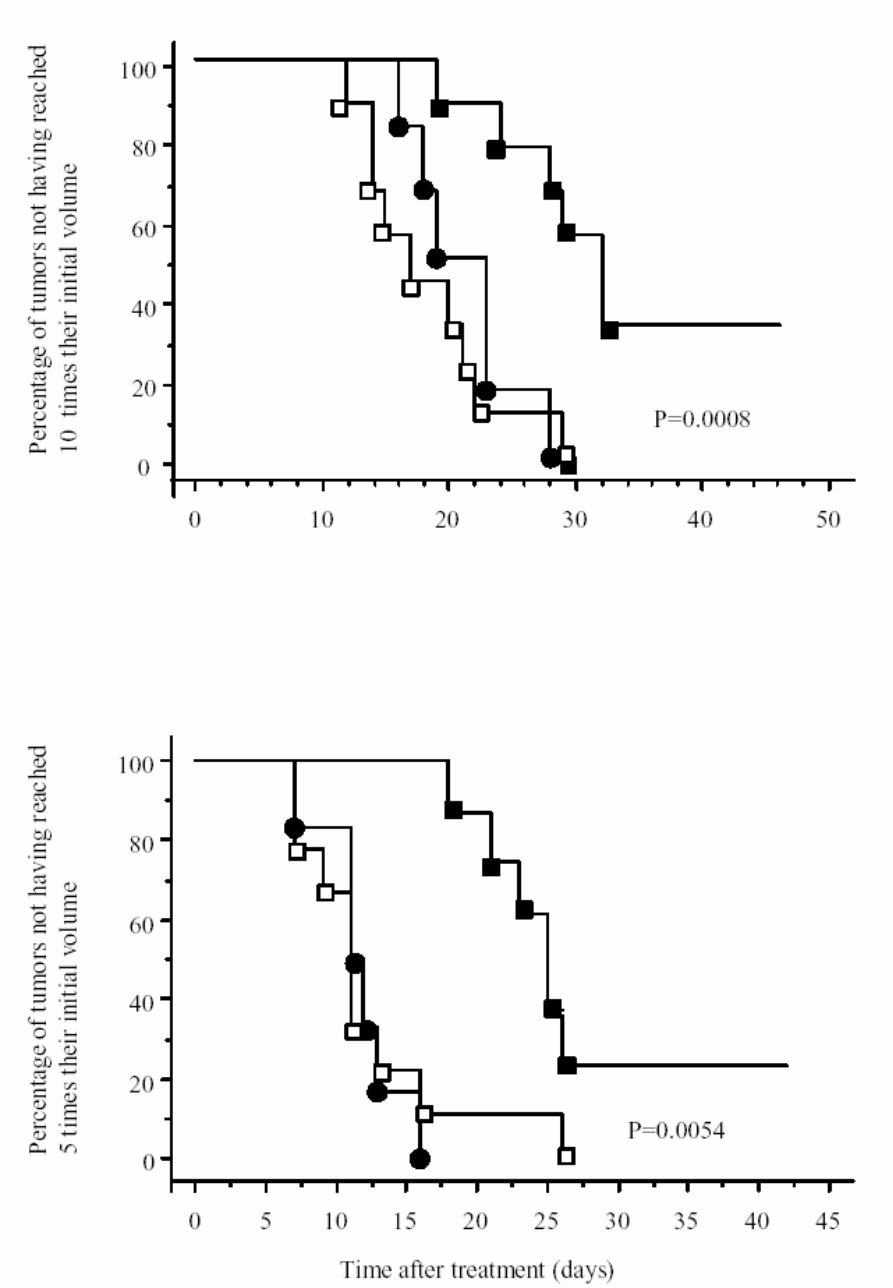


Figure 4. Kaplan-Meier curves of U87 tumors of control mice (no PS, light) [*black circles*] or mice treated by PDT, using TPC [*white squares*] or TPC-Ahx-ATWLPPR [*black squares*] (a) considering the percentage of tumors not having reached 5 times, (b) 10 times, their initial volume at the end point. PDT conditions using RSM (fluence rate=85 mW/cm^2, fluence=120 J/cm^2, PS dose=1.75 µmol/kg). *Bars*, ± standard deviation (n=10, for each experimental group). Statistical analysis was performed using the log-rank test (*p* values represent comparison "TPC " *vs.* "TPC-Ahx-ATWLPPR").

DISCUSSION

As opposed to chemotherapy where the main factor to be determined is the drug dose, by a classical dose escalation methodology, PDT is not only linked to a molecule but is a complex technique wherein several factors (PS, light dose and oxygen) interact with each others. The *in vivo* treatment condition retained could be compared to *in vitro* conditions that proved efficient in clonogenic assays of photodynamic activity using HUVEC (2) (Table 3). *In vivo* plasma concentrations of the conjugated-PS were higher than in cell culture medium *in vitro* (14). This comparison is all the more valid as, in *in vivo* experiments, targeted endothelial cells are in direct contact with plasma, similarly to HUVEC with the culture medium. Likewise, light doses were higher *in vivo* than those previously described *in vitro* (Table 3) as is often the case (23-25). This could be expected, since, in *in vitro* tests, light irradiation is applied on 2-D cultured cells, while a tumor is a 3-D tissue with intrinsic absorbing, scattering and reflecting properties, decreasing progressively light intensity as light progresses from the surface to the bottom of the tumor (8, 4).

Experiments used for the statistical inference resulted from a Doehlert experimental design. This design allowed us to divide by eight the number of mice compared with a complete factorial design. No theoretical knowledge of the physical and chemical *phenomena*, occurring during PDT, was required, as opposed to explicit dosimetry. The proposed alternative approach aims at determining an empirical model from *in vivo* data that is more suited to optimize PDT modalities. Actually, there is no guideline to select optimal modalities of PDT for new photosensitizers but only for the photosensitizing agents approved by the U.S. Food and Drug Administration such as for instance Foscan® and Photofrin®_determined by prior clinical trials.

RSM is a useful tool of statistical inference for PDT optimization, but it requires to determine primarily an appropriate experimental domain. To select the limit points of the experimental domain concerning light doses, the choice was based on other PS such as Foscan® or Verteporfin (15, 12, 26). The presence of significant interaction coefficients in the response surface models partly confirmed the reciprocity between PS and light doses as shown in (27). We observed an opposite interaction between fluence rate and TPC-Ahx-ATWLPPR dose, leading to the conclusion that an improvement of PDT outcome required to associate either a low fluence rate with a high PS dose or, conversely. High fluence rates have been shown to reduce intratumoral oxygen levels (28, 9), and thus to decrease PDT efficiency. Moreover, it is suggested to select a fluence level in correspondence with the PS dose.

We limited our study to the factors the most widely considered. But RSM could also be suggested to optimize other factors that could act on PDT outcome, *e.g.* formulation of the PS, mode of administration (*e.g.* intravenous, intraperitoneal, intratumoral) or light wavelength. It may

also be interesting to add the DLI as a fourth factor to our experimental design, as it may not be perfectly optimal, which could be achieved relatively easily with the Doehlert design. Indeed, pharmacokinetic studies have traditionally been used for the choice of DLI , which led to the selection of a DLI of 96h for Foscan® in preclinical and clinical studies. However, numerous studies have since shown that shorter DLI may lead to higher efficiency, which means that pharmacokinetic studies may not always lead to the best choice of DLI (15).

The empirical optimization approach of PDT treatment, proposed herein, does not substitute itself to *in situ* dosimetry for which three possible approaches have been described: (i) direct dosimetry, in which $^1O_2$ is directly measured (3); (ii) explicit dosimetry, in which the three interconnected variables (light, oxygen and PS) are measured and the production of $^1O_2$ is estimated; (iii) implicit dosimetry, in which a surrogate for $^1O_2$ generation is deduced (8). RSM could be suggested as an "*Experimental design dosimetry*" when light doses quantities and PS dose are not known, completed by an *in situ* real-time dosimetry to individualize treatment.

CONCLUSION

The research question addressed in this paper deals with the optimization of the *in vivo* PDT modalities with a newly-developed photosensitizing agent. The usual methods are to test, either all the combinations of factors, which requires a large number of mice, or a step-by-step approach wherein each factor is varied while the other ones are fixed. Nevertheless, because of the interactions between the factors involved in PDT, this approach is unsatisfactory. For the first time, an original approach was developed, based on RSM. The *Experimental design dosimetry* is an alternative empirical approach that brings two main benefits for the optimization of *in vivo* PDT modalities: (1) no prior knowledge about photophysical or photochemical parameters is required and (2) the experimental cost is minimized. Three factors: fluence, fluence rate and PS dose, were simultaneously varied. The *in vivo* validation results confirmed relevance of the optimal conditions provided by the proposed empirical approach.

Acknowledgements

This work was supported by the research funds of the French Ligue Nationale Contre le Cancer.

REFERENCES

1. Brown SB, Brown EA, Walker I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. *Lancet Oncol* 2004;5:497-508.
2. Tirand L, Frochot C, Vanderesse R, *et al.* A peptide competing with VEGF165 binding on neuropilin-1 mediates targeting of a chlorin-type photosensitizer and potentiates its photodynamic activity in human endothelial cells. *J Control Release* 2006;111:153-164.
3. Jarvi MT, Niedre MJ, Patterson MS, *et al.* Singlet oxygen luminescence dosimetry (SOLD) for photodynamic therapy: current status, challenges and future prospects. *Photochem Photobiol* 2006;82:1198-1210.
4. Wilson BC, Patterson MS, Lilge L. Implicit and explicit dosimetry in photodynamic therapy: a new paradigm *Lasers Med. Sci.* 1997;12:182-199.
5. Hetzel FW, Brahmavar SM, Chen Q, *et al.* Photodynamic Therapy Dosimetry, A Task Group Report of the General Medical Physics Committee of the Science Council. Vol 88. Medical Physics Publishing ed; 2005.
6. Zhou X, Chen B, Hoopes PJ, *et al.* Tumor vascular area correlates with photosensitizer uptake: analysis of verteporfin microvascular delivery in the Dunning rat prostate tumor. *Photochem Photobiol* 2006;82:1348-1357.
7. Wood SR, Holroyd JA, Brown SB. The subcellular localization of Zn(II) phthalocyanines and their redistribution on exposure to light. *Photochem Photobiol* 1997;65:397-402.
8. Wilson BC, Patterson MS. The physics, biophysics and technology of photodynamic therapy. *Phys Med Biol* 2008;53:61-109.
9. Robinson DJ, de Bruijn HS, van der Veen N, *et al.* Fluorescence photobleaching of ALA-induced protoporphyrin IX during photodynamic therapy of normal hairless mouse skin: the effect of light dose and irradiance and the resulting biological effect. *Photochem Photobiol* 1998;67:140-149.
10. Chen Q, Wilson BC, Shetty SD, *et al.* Changes in in vivo optical properties and light distributions in normal canine prostate during photodynamic therapy. *Radiat Res* 1997;147:86-91.
11. Niedre MJ, Patterson MS, Giles A, *et al.* Imaging of photodynamically generated singlet oxygen luminescence in vivo. *Photochem Photobiol* 2005;81:941-943.
12. Jones HJ, Vernon DI, Brown SB. Photodynamic therapy effect of m-THPC (Foscan) in vivo: correlation with pharmacokinetics. *Br J Cancer* 2003;89:398-404.
13. Thomas N, Tirand L, Chatelut E, *et al.* Tissue distribution and pharmacokinetics of an ATWLPPR-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1 in glioma-bearing nude mice. *Photochem Photobiol Sci* 2008;7:433-441.
14. Tirand L, Thomas N, Dodeller M, *et al.* Metabolic profile of a peptide-conjugated chlorin-type photosensitizer targeting neuropilin-1: an in vivo and in vitro study. *Drug Metab Dispos* 2007;35:806-813.
15. Cramers P, Ruevekamp M, Oppelaar H, *et al.* Foscan uptake and tissue distribution in relation to photodynamic efficacy. *Br J Cancer* 2003;88:283-290.
16. Box GEP, Wilson KB, editors. On the Experimental Attainment of Optimum Conditions 1951.
17. Box GEP, Draper NR, editors. Empirical Model-Building and Response Surfaces; 1987.
18. Carter W, Jr, Wampler G. Review of the application of response surface methodology in the combination therapy of cancer. *Cancer Treat Rep* 1986;70:133-140.
19. Pinel S, Barberi-Heyob M, Cohen-Jonathan E, *et al.* Erythropoietin-induced reduction of hypoxia before and during fractionated irradiation contributes to improvement of radioresponse in human glioma xenografts. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2004;59:250-259.
20. Triesscheijn M, Baas P, Schellens JH, *et al.* Photodynamic therapy in oncology. *Oncologist* 2006;11:1034-1044.
21. Galle J, Loeffler M, Drasdo D. Modeling the effect of deregulated proliferation and apoptosis on the growth dynamics of epithelial cell populations in vitro. *Biophys J* 2005;88:62-75.
22. Gill KR, Wolfsen HC, Preyer NW, *et al.* Pilot study on light dosimetry variables for photodynamic therapy of Barrett's esophagus with high-grade dysplasia. *Clin Cancer Res* 2009;15:1830-1836.
23. Bechet D, Couleaud P, Frochot C, *et al.* Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. *Trends Biotechnol* 2009;26:612-621.
24. Schneider R, Tirand L, Frochot C, *et al.* Recent improvements in the use of synthetic peptides for a selective photodynamic therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2006;6:469-488.
25. Taquet JP, Frochot C, Manneville V, *et al.* Phthalocyanines covalently bound to biomolecules for a targeted photodynamic therapy. *Curr Med Chem* 2007;14:1673-1687.
26. Pogue BW, O'Hara JA, Demidenko E, *et al.* Photodynamic therapy with verteporfin in the radiation-induced fibrosarcoma-1 tumor causes enhanced radiation sensitivity. *Cancer Res* 2003;63:1025-1033.
27. Zhou X, Pogue BW, Chen B, *et al.* Pretreatment photosensitizer dosimetry reduces variation in tumor response. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2006;64:1211-1220.

28. Henderson BW, Busch TM, Vaughan LA, *et al*. Photofrin photodynamic therapy can significantly deplete or preserve oxygenation in human basal cell carcinomas during treatment, depending on fluence rate. *Cancer Res* 2000;60:525-529.

Titre : Thérapie photodynamique ciblant la vascularisation tumorale par l'adressage du co-récepteur neuropiline-1. Vers l'élaboration de peptides biologiquements plus stables

Résumé

La thérapie photodynamique (PDT) est une modalité de traitement des petites tumeurs localisées, reposant sur l'action conjuguée d'un photosensibilisateur (PS), de la lumière et de l'oxygène. Dans le cadre d'un nouveau mode de PDT, la VTP (*vascular targeted photodynamic therapy*), notre stratégie a consisté à favoriser l'effet anti-vasculaire du traitement par ciblage de la néo-vascularisation tumorale. Pour cela, nous avons étudié *in vitro* et *in vivo* un PS de type chlorine (TPC) couplé, *via* le bras espaceur (Ahx), à un heptapeptide (ATWLPPR) spécifique d'un co-récepteur du VEGF, la neuropiline-1 (NRP-1).

Une étude comparative de la TPC *versus* le PS conjugué (TPC-Ahx-ATWLPPR), a permis de mettre en évidence *in vitro*, grâce à une technique d'ARN interférence visant à éteindre l'expression de NRP-1, une incorporation cellulaire récepteur-dépendante du conjugué. *In vivo*, l'accumulation préférentielle de la TPC-Ahx-ATWLPPR au niveau de l'endothélium vasculaire de la tumeur ainsi que son effet anti-vasculaire après PDT ont été mises en évidence.

Une étude de stabilité *in vitro* et *in vivo* du conjugué a été réalisée. *In vivo*, la séquence peptidique est dégradée 4 h après injection par voie intra-veineuse. Des études de pharmacocinétique et de biodistribution tissulaire de la TPC-Ahx-ATWLPPR et de son principal produit de dégradation, TPC-Ahx-A ont été réalisées chez la souris *nude* xénogreffée. La dégradation de la partie peptidique est majoritaire dans les organes du système réticulo-endothélial où l'accumulation du conjugué est la plus importante.

Dans le but d'augmenter la stabilité *in vivo* du peptide adresseur, de nouveaux peptides ont été synthétisés, puis couplés à la TPC et testés. Le pseudopeptide Aψ[CH_2NH]TWLPPR est prometteur car il reste affin vis-à-vis de NRP-1 et après couplage au PS, il ne subit aucune dégradation dans le 8plasma *in vivo* 4 h après injection par voie intra-veineuse.

Mots clefs : Thérapie photodynamique, adressage vasculaire, neuropiline-1, pseudopeptides, ARN interférence

Tittle : Photodynamic therapy targeting tumor vasculature *via* neuropilin-1 co-receptor. Design of peptides more stable

Abstract

Photodynamic therapy (PDT) is a treatment modality against small localized tumors, based on the combined action of a photosensitizer (PS), light and oxygen. A new method of PDT, the VTP (vascular targeted photodynamic therapy) was studied. The purpose of our strategy is to promote the anti-vascular effect of PDT by targeting the tumor vasculature. We studied the behaviour of the tetraphenylchlorine (TPC) conjugated, *via* the Ahx spacer, to a VEGF co-receptor (neuropilin-1) specific heptapeptide (ATWLPPR), *in vitro* and *in vivo*.

A comparative study of TPC *versus* the conjugated PS, TPC-Ahx-ATWLPPR, allowed us to identify *in vitro*, using a technique of RNA interference-mediated silencing of NRP-1, a receptor-dependent uptake of the conjugate. *In vivo*, a preferential accumulation of TPC-Ahx-ATWLPPR in endothelial cells and its anti-vascular effect were demonstrated.

A study of stability *in vitro* and *in vivo* of the conjugate was conducted. *In vivo*, the peptide sequence was degraded 4 h after intra-venous injection. Pharmacokinetics and tissue biodistribution studies of TPC-Ahx-ATWLPPR and its main degradation product, TPC-Ahx-A, was performed in bearing *nude* mice. The degradation process of the peptide is important in the organs of the reticulo-endothelial system, where the accumulation of the conjugate is majority.

In order to improve *in vivo* stability of the targeting-peptide, new peptides were design and tested. The pseudopeptide Aψ[CH_2NH] TWLPPR bound NRP-1, and after coupling with the PS, no degradation is observed in plasma *in vivo* 4 h after intra-venous injection.

Keywords: Photodynamic therapy, vascular targeting, neuropilin-1 pseudopeptides, RNA interference.