

Université de Montréal

**Caractérisation de la thérapie photodynamique avec le bleu de
toluidine dans l'élimination sélective des cellules leucémiques
de la moelle osseuse**

Par

Sylvie Dussault

Programme de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès science (M.Sc.)
en sciences biomédicale



novembre, 2002

© Sylvie Dussault, 2002

W
4
L58
2003
N. 063

Direction des bibliothèques

AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

**Caractérisation de la thérapie photodynamique avec le bleu de
toluidine dans l'élimination sélective des cellules leucémiques de la
moelle osseuse**

Présenté par

Sylvie Dussault

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Louis Gaboury

Robert Bissonnette

Pierre Chartrand

Résumé français

Le bleu de toluidine (TBO) est un colorant cationique qui peut être utilisé comme aide à la détection des carcinomes de la cavité orale. L'objectif de ce projet était d'étudier le potentiel du TBO comme photosensibilisateur en thérapie photodynamique (TPD) pour l'élimination sélective des cellules leucémiques de la moelle osseuse. Les données de spectrofluorométrie ont démontré que les cellules leucémiques K562 absorbent jusqu'à 6,7 fois plus de TBO que les cellules normales de moelle osseuse (MO). Les études de microscopie à fluorescence avec des colorants spécifiques aux différentes organelles de la cellule ont démontré une localisation aux lysosomes et au réticulum endoplasmique du TBO dans les cellules K562. Les essais de clonogénicité ont démontré une sensibilité similaire des K562 et des cellules de MO normales à la TBO-TPD. Ceci suggère que même si les K562 accumulent plus de TBO, la TBO-TPD ne pourrait pas être utilisée pour la purge de moelle osseuse dans ces conditions.

Mots clés français

Thérapie photodynamique,
Bleu de toluidine,
Leucémie myéloïde chronique,
Purge de moelle osseuse,
Localisation intracellulaire

Résumé anglais

Toluidine blue (TBO) is a thiazine dye that can be used as an aid for the detection of oral carcinoma. The aim of this project was to study the potential of TBO as a photodynamic therapy (PDT) photosensitizer for the selective elimination of leukemic cells. Spectrofluorometry data showed that K562 leukemic cells accumulate up to 6.7 times more TBO than normal bone marrow (NBM) cells after incubation with 2 $\mu\text{g/mL}$. Fluorescence microscopy studies with organelle specific dyes showed TBO is localized to lysosomes and endoplasmic reticulum in K562 cells. Clonogenic assays showed a similar reduction in survival of K562 cells and NBM cells following TBO-PDT which was significant for both K562 and NBM cells with TBO concentrations as low as 0,15 $\mu\text{g/mL}$. In conclusion, TBO accumulates preferentially in leukemic cells. However its activation by visible light does not allow a selective elimination of leukemic cells.

Mots clés anglais

Photodynamic therapy,
Toluidine blue,
Chronic myelogenous leukemia,
Bone marrow purging,
Intracellular localization

Table des matières

Chapitre 1 : Introduction et revue de littérature	1
1.1 Thérapie photodynamique.....	2
1.1.1 Historique	2
1.1.2 Mode d'action de la thérapie photodynamique.....	2
1.1.3 Photosensibilisateurs	5
1.1.4 Lumière.....	7
1.2 Leucémies.....	7
1.2.1 Leucémies aiguës	8
1.2.2 Leucémie lymphoïde chronique.....	8
1.2.3 Leucémie myéloïde chronique.....	8
1.3 Greffes de moelle osseuse et techniques de purge.....	11
1.4 Hypothèse	13
Chapitre 2 : Article	14
Photodynamic therapy with toluidine blue induces a similar reduction in cell viability in K562 and normal bone marrow cells Sylvie Dussault, Gilles Viau, Robert Bissonnette	
2.1 Abstract	15
2.2 Introduction	16
2.3 Material and methods.....	17
2.4 Results	19
2.4.1 Absorption of TBO	19
2.4.2 Intracellular localization of TBO	21
2.4.3 Cytotoxicity of TBO-PDT on K562 and NBM cells	23
2.5 Discussion.....	25
2.6 References	26
Chapitre 3 : Discussion et conclusion.....	29
Références.....	32

Liste des figures

Figure 1 : TBO absorption by K562 and NBM cells.....	20
Figure 2 : Different TBO distribution pattern in K562 and NBM cells	21
Figure 3 : Intracellular localization of TBO in K562 cells	22
Figure 4 : Cytotoxicity of TBO-PDT on K562 and NBM cells.....	24

Liste des sigles et abréviation

AbréviatiOn		Nom complet
Française	Anglaise	
4-HC		4-hydroperoxycyclophosphamide
	Abs	Peak absorption
Ac		Anticorps
ALA		Acide aminolevulinique
	BFLC	BODIPY FL C ₅ -Ceramide
BPD-MA	BPD-MA	Benzoporphyrin derivative monoacid ring A
	Em	Peak emission
	ER	Réticulum endoplasmique
	ERT	ER-Tracker Blue-White DPX
	FBS	Fetal bovine serum
GvH		Réaction greffe contre hôte
HLA		Human leucocyte antigen ou système HLA
	IMDM	Iscove's Modified Dulbecco's Medium
LAL		Leucémie aigue lymphoblastique
LAM		Leucémie aigue myéloïde
LCI		Lysyl chlorin p6 imide
LCP	LCP	Lysyl chlorin p6
LLC		Leucémie lymphoïde chronique
LMC	CML	Leucémie myéloïde chronique
LuTex		Lutetium texaphyrin
	LT	LysoTracker Yellow HCK-123
MAP		Mitogen-activated protein
MCP	MCP	Monocationic porphyrin
	MT	MitoTracker Green FM
	NBM	Cellules normales de moelle osseuse
NPe6		N-aspartyl chlorin e6
	p/s	Pénicilline/Streptomycine
Pc		Phthalocyanine
PcM	PcM	Porphycene monomer
Ph		Chromosome de Philadelphie

Abréviation		Nom complet
Française	Anglaise	
PI		Phosphatidylinositol
PS	PS	Photosensibilisateur
ROS		Intermédiaires d'oxygène réactif
	RPMI	Roswell Park Memorial Institute 1640 media
SAP		Stress-activated protein
TBO	TBO	Bleu de toluidine
TPD	PDT	Thérapie photodynamique

Remerciements

Dans le contexte de la fin de ma maîtrise, j'aimerais tout d'abord remercier Dr Robert Bissonnette de m'avoir accueilli dans son laboratoire de Photodynamie ainsi que pour l'encadrement et les encouragements tout au long de ma maîtrise. J'aimerais aussi remercier Gilles Viau et les autres membres du laboratoire pour les conseils et les moments de divertissement. Et un merci tout spécial à ma famille qui m'a supportée et encouragée tout au long de mes études universitaires.

Chapitre 1 : Introduction et revue de littérature

1.1 Thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique (TPD) est un nouveau mode de traitement du cancer qui consiste en l'administration d'un médicament inactif, un photosensibilisateur (PS), suivi d'une exposition à la lumière. Celle-ci active le PS et mène à la formation d'intermédiaires d'oxygène réactif (ROS) qui peuvent éventuellement causer la mort cellulaire.

1.1.1 Historique

Dès l'antiquité la lumière était utilisée dans le traitement de plusieurs maladies. Par contre, le concept de la thérapie photodynamique n'est connu que depuis une centaine d'années alors qu'Oscar Raab a observé que la combinaison d'acridine et de lumière avait un effet létal sur un organisme vivant (paramecium). Les premiers essais sur les humains ont été faits au début du siècle dernier pour le traitement de tumeurs de la peau avec de l'éosine combinée à de la lumière blanche ¹. C'est Santé Canada qui, en 1993, a approuvé la TPD pour la première fois dans le cadre d'un traitement du cancer de la vessie avec le porfimère sodique ^{1,2}.

1.1.2 Mode d'action de la thérapie photodynamique

Les principes physico-chimiques impliqués dans la TPD sont basés sur l'excitation du PS par la lumière. Suite à l'illumination, le PS passe de l'état fondamental à l'état singulet (S_1). Cet état perd rapidement son énergie et ne peut donc pas interagir avec son microenvironnement. Par contre, le PS à l'état S_1 peut passer à l'état triplet (T_1), un état plus stable qui contribue à l'effet de la TPD. Celui-ci génère deux types de réactions, les réactions de type I menant à la formation de radicaux libres et d'ions radicalaires et les réactions de type II impliquant un transfert d'énergie du PS à l'oxygène. Globalement, les deux mécanismes mènent à des dommages oxydatifs du tissu cible induisant ainsi la mort cellulaire ^{3,4}. Il a été démontré que les deux types de réactions sont généralement présentes suite à la TPD, mais à faible concentration d'oxygène les réactions de type I deviennent plus importantes ⁵.

À cause de la capacité limitée de migration des ROS, le site initial du photodommage dépend de la localisation intracellulaire du PS. Ainsi, les PS qui ne pénètrent pas la cellule sont peu efficaces même s'ils génèrent beaucoup de ROS ⁶. Le mode de mort cellulaire induit par la TPD (apoptose ou nécrose) dépend de plusieurs facteurs tels que le PS, sa localisation intracellulaire, le type de cellule, la dose de lumière, etc. Mais, puisque la localisation intracellulaire détermine le site initial de photodommage, la localisation a une forte influence sur le type et l'intensité de réponse à la photoactivation ⁷.

La perte de la fonction mitochondriale est un événement critique dans le processus d'induction de l'apoptose ⁸. Ainsi les PS qui se localisent aux mitochondries tel que le BPD-MA (dérivé monoacide de la 4-benzoporphyrine A) sont généralement associés à une induction rapide de l'apoptose ^{9, 10}. En effet, suite à la TPD avec le BPD-MA, des changements morphologiques caractéristiques de l'apoptose peuvent être observés entre une et deux heures après le traitement ⁸. Granville *et al.* ont démontré que la TPD avec le BPD-MA dans les cellules HeLa, Jurkat, endothéliales et de muscle lisse cause une relâche immédiate du cytochrome c dans le cytoplasme. Cette relâche de cytochrome c est suivie de l'activation des caspases 3, 6, 7, 8 et 9 pouvant être observée dès une heure après le traitement ^{8, 11-13}. Le cytochrome c est nécessaire à l'activation de la caspase 9 qui peut par la suite activer les caspases effectrices, soit les caspases 3, 6 et 7. La caspase 8 cliverait quant à elle la protéine Bid qui transloquerait à la mitochondrie et activerait la relâche du cytochrome c créant ainsi une boucle d'amplification de la réponse apoptotique ^{11, 14}.

L'induction de l'apoptose suite à la TPD avec des PS se localisant aux lysosomes est moindre et ralentie par rapport à une localisation mitochondriale du PS. Il a été démontré pour plusieurs PS se localisant aux lysosomes (LuTex, lutetium texaphyrin; NPe6, *N*-aspartyl chlorin e6; LCP, lysyl chlorin p6 et LCI, lysyl chlorin p6 imide) que cette faible induction de l'apoptose est due à des photodommages à la procaspase-3 et à la caspase-3 diminuant ainsi la quantité de caspase-3 active ¹⁵. Le délai dans l'induction de l'apoptose pourrait quant à lui être dû à une action indirecte du PS causant une relâche des protéases des lysosomes qui vont causer des dommages aux

mitochondries et la relâche du cytochrome c^{15, 16}. Il a aussi été suggéré par Moan *et al.* que le mécanisme d'action est plutôt lié à une relocalisation du PS à un endroit plus susceptible de la cellule tel que la mitochondrie ou le noyau^{4, 17}.

Les PS se localisant aux membranes peuvent engendrer une pléiotropie d'effets qui dépendent entre autres de la position relative des molécules de PS par rapport aux protéines, du type d'intermédiaire réactif formé et de la réactivité des membranes avec les espèces réactives formées¹⁸⁻²⁰. De plus, l'oxydation de lipides membranaires peut avoir un effet indirect sur les tumeurs via des médiateurs de l'inflammation⁴.

En plus d'un effet direct au niveau cellulaire, la TPD peut avoir des effets vasculaires et causer des réactions immunitaires et inflammatoires. Les dommages induits à la microcirculation contribuent au contrôle tumoral à long terme puisqu'ils peuvent causer une hypoxie sévère et prolongée à la tumeur. Les mécanismes et l'importance des effets vasculaires varient selon le PS et peuvent également dépendre de la réaction inflammatoire. Par exemple, la TPD avec le porfimère sodique cause une constriction des vaisseaux, des fuites de macromolécules, l'adhésion des leucocytes et la formation d'un thrombus par activation des plaquettes et relâche de thromboxane^{4, 6, 21}.

Une activité anti-tumorale non spécifique des cellules du système inflammatoire peut être initiée par un dommage phototoxique subléta, tel que les dommages aux membranes cellulaires. La photo-oxydation des lipides membranaires active les phospholipases menant à une dégradation accélérée des phospholipides en acide arachidonique et ses métabolites (eicosanoïdes) qui sont des médiateurs puissants de l'inflammation. La réponse inflammatoire cause aussi un appel massif de mastocytes, de monocytes et surtout de neutrophiles. Ces derniers peuvent causer des dommages à l'endothélium vasculaire ou détruire le parenchyme de la tumeur. Lorsque les neutrophiles subissent des dommages létaux, ils relâchent des substances chimiotactiques permettant un nouvel afflux de cellules de l'immunité^{4, 6, 21}.

La TPD peut aussi induire une réaction immunitaire anti-tumorale spécifique qui pourrait permettre le contrôle à long terme des tumeurs. Les macrophages ayant participé à la réaction inflammatoire pourraient agir comme cellules présentatrices

d'antigènes et présenter des peptides issus de cellules tumorales phagocytées. Ainsi, les lymphocytes activés pourraient éliminer des petits foyers de cellules cancéreuses ayant échappés aux autres effets anti-tumoraux de la TPD. Par contre, puisque l'inflammation est souvent accompagnée d'un effet immunosuppresseur, suite à la TPD un effet immunosuppresseur qui dépend du PS utilisé peut parfois être observé. ^{4, 6, 21}.

1.1.3 Photosensibilisateurs

La TPD avec le porfimère sodique est approuvée dans plusieurs pays entre autres pour le traitement du cancer de la vessie, de l'œsophage et du poumon ^{3, 22}. Par contre le porfimère sodique possède certains désavantages, il est retenu par les tissus cutanés, ce qui cause une photosensibilité prolongée. De plus, il absorbe très peu à la longueur d'onde utilisée en thérapie (630 nm) limitant le traitement à une profondeur de moins de 5 mm de tissus ^{3, 5}.

Des PS de seconde génération ont donc été développés pour tenter de diminuer les effets secondaires associés au porfimère sodique et pour développer de nouvelles applications pour la TPD. La TPD avec l'acide aminolevulinique (ALA) est utilisée pour le traitement des kératoses actiniques du visage et du cuir chevelu. Dans la voie de synthèse de l'hème, l'ALA est le précurseur de la protoporphyrine IX qui est la molécule agissant comme PS. L'utilisation d'ALA sous sa forme topique permet d'éliminer les problèmes de photosensibilité systémique, mais il ne pénètre pas très profondément dans la peau. ^{3, 5, 23}. Le BPD-MA, un autre PS de la famille des porphyrines, est approuvé pour le traitement de la dégénérescence maculaire et des essais cliniques sont en cours pour le traitement de cancers de la peau non-mélanocytaires. Par rapport au porfimère sodique, le BPD-MA a une meilleure absorption à une longueur d'onde plus élevée (690 nm), ce qui permet une meilleure pénétration de la lumière dans le tissu et il est rapidement excrété ce qui diminue la durée de la photosensibilité cutanée ^{3, 22}.

Les phthalocyanines (Pc) tels que le ZnPc, l'AlSPc et le Pc4 ont également été étudiés pour le traitement de néoplasies de la peau, du sein et du poumon. Par rapport

au porphimère sodique, les Pc ont une plus forte absorbance (jusqu'à 2 fois plus) à des longueurs d'onde plus élevées ^{1, 3, 5}.

Parmi les phénothiazines, le bleu de méthylène est le seul utilisé en clinique pour la TPD. Il sert à la décontamination des unités de plasma fraîchement congelées par la croix rouge suisse et allemande ³. Le bleu de toluidine (TBO) est utilisé depuis de nombreuses années en médecine pour aider à la détection de certains carcinomes asymptomatiques tels que les carcinomes épidermoïdes buccaux, du larynx et de l'œsophage ^{24, 25}. Plus récemment, il a aussi été démontré que le TBO colore spécifiquement les dépôts de prions associés aux encéphalopathies spongiformes et pourrait ainsi devenir un outil diagnostique post-mortem pour ces pathologies ²⁶. Le potentiel photosensibilisateur du TBO a été démontré par la photosensibilisation de bactéries responsables de la carie, de la plaque dentaire et des ulcères gastriques ainsi que des levures responsables des candidoses ²⁷⁻²⁹. Burns *et al.* ont démontré que l'utilisation de 25 µg/mL de TBO suivi d'une exposition de 60 secondes avec un laser helium-néon (HeNe; 33,6 J/cm²) permet de diminuer significativement la survie des quatre principales souches bactériennes responsables de la carie dentaire, soit *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Lactobacillus casei* et *Actinomyces viscosus* ³⁰. Cette technique permet aussi une forte réduction de la viabilité de la flore bactérienne mixte présente dans des échantillons de plaque sous-gingivale de patients ayant des parodontites chroniques ³¹. De plus, lorsque des bactéries parodontopathogènes telles que *Porphyromonas gingivalis* et *Fusobacterium nucleatum* sont présentes dans ces échantillons, elles sont aussi très sensibles à la TBO-TPD ³¹. Par la suite, il a été démontré que la muqueuse buccale de rat n'est aucunement affectée par la TBO-TPD (200 µg/mL de TBO; 340 J/cm² avec un laser HeNe) laissant croire à une application possible de la TBO-TPD en médecine dentaire ³². Au niveau cellulaire, il a été démontré que les lignées cellulaires de carcinome épidermoïde A-253 et HeLa sont sensibles à la TBO-TPD et que dans les A-253 le TBO est un PS plus efficace que la pyronine Y, la rhodamine 123 et le merocyanine 540 ^{33, 34}.

Plus récemment, notre groupe a démontré que la TBO-TPD cause une diminution de 97% de l'activité métabolique des cellules Jurkat 24 heures après la TPD avec 0,15

$\mu\text{g/mL}$ de TBO et 11 J/cm^2 de lumière blanche. De plus, dans ces mêmes conditions, jusqu'à 82% de fragmentation de l'ADN après 24 heures et une augmentation jusqu'à 5 fois de l'activité type caspase-3 après 4 heures ont été observés suggérant une induction de l'apoptose par la TBO-TPD dans cette lignée cellulaire de leucémie lymphoblastique aiguë ³⁵.

1.1.4 Lumière

En clinique, l'efficacité de la TPD dépend en grande partie d'une transmission adéquate de la lumière à travers le tissu cible. La source de lumière utilisée doit comprendre la longueur d'onde qui active le PS, de préférence une longueur d'onde qui pénètre bien les tissus. La dose de lumière utilisée dépend quant à elle du type de néoplasme traité, de sa location lors du traitement *in vivo* et de sa taille lorsqu'il s'agit d'une tumeur solide. Les sources de lumière non-cohérentes furent les premières utilisées en TPD et ont toujours un rôle important puisqu'elles permettent l'exposition de plus grandes surfaces avec un spectre plus large. Les sources non-cohérentes sont les plus utilisées en dermatologie. Par contre, les lasers sont plus utilisés pour le traitement des organes creux puisqu'ils peuvent facilement être couplés à une fibre optique pour insertion dans un endoscope. Ils permettent de produire de la lumière à une longueur d'onde très spécifique tout en ayant une irradiance suffisante au traitement ^{4, 23, 36}.

1.2 Leucémies

Les leucémies sont des néoplasmes malins affectant les cellules souches hématopoïétiques et sont caractérisées par le remplacement des cellules de la moelle osseuse par des cellules transformées ³⁷⁻³⁹. Il a été démontré que l'exposition aux radiations ionisantes et à certaines substances chimiques telles que le benzène peuvent augmenter le risque de leucémies. De plus, certaines anomalies génétiques comme le syndrome de Down et l'anémie de Fanconi peuvent être des facteurs prédisposants ^{37, 39}. Les leucémies sont classées en deux grandes catégories selon le stade de maturation cellulaire : les leucémies aiguës et les leucémies chroniques ^{38, 39}.

1.2.1 Leucémies aiguës

Les leucémies aiguës sont des leucémies à évolution rapide. Les cellules normales de la moelle osseuse y sont remplacées par un grand nombre de myeloblastes (leucémie myéloïde aiguë – LMA) ou de lymphoblastes (leucémie lymphoblastique aiguë – LLA) transformés ³⁷⁻³⁹. L'accumulation de cellules blastiques leucémiques est due non seulement à une expansion clonale, mais aussi à une non-maturation de ces cellules ³⁸. Cette accumulation de cellules blastiques cause des problèmes de l'hématopoïèse entraînant anémie, thrombopénie et granulopénie ³⁹.

La LLA est la forme de leucémie la plus commune chez l'enfant avec une incidence maximale entre les âges de 3 et 5 ans. Elle peut aussi survenir, moins fréquemment, à l'âge adulte. Au contraire, la LMA est plus fréquente chez l'adulte et son incidence augmente avec l'âge. Dans les deux cas, les probabilités de rémission sont bonnes, mais dépendent de plusieurs facteurs dont l'âge des patients ³⁹.

1.2.2 Leucémie lymphoïde chronique

Les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) sont dues à une prolifération de lymphocytes (B, le plus souvent) transformés affectant les ganglions lymphatiques et autres tissus lymphoïdes. La prolifération est généralement peu agressive, mais la moelle osseuse est progressivement infiltrée ^{37, 39}.

La LLC est parmi les formes de leucémie les plus fréquentes, elle compte pour plus de 25 % des cas. Les personnes de plus de 60 ans sont les plus atteintes et les hommes sont deux fois plus susceptibles que les femmes. La cause de la maladie est inconnue, mais certains cas sont familiaux, laissant présager un facteur génétique ^{37, 39}.

1.2.3 Leucémie myéloïde chronique

Les leucémies myéloïdes chroniques (LMC) comptent pour environ 20% des cas de leucémie ^{40, 41}. Elles sont dues à la transformation et à l'expansion clonale de cellules souches pluripotentes principalement dans la moelle osseuse, mais aussi à certains sites extramédullaires tels que le foie et la rate. Le clone malin comprend surtout des

granulocytes, mais aussi des monocytes, des mégacaryocytes et quelques lymphocytes B et T ^{38, 39}. La LMC peut survenir à tout âge, mais son incidence augmente exponentiellement avec l'âge ^{39, 42}.

Le chromosome de Philadelphie (Ph) est une anomalie cytogénétique retrouvée chez environ 95% des patients atteints de LMC. Cette anomalie résulte d'une translocation réciproque entre les chromosomes 9 et 22. Ainsi une partie du gène *c-abl* est juxtaposé au gène *bcr* sur le chromosome 22, ce qui résulte en un gène codant pour une protéine chimérique *bcr-abl* ^{39, 43, 44}. Le gène *c-abl* est un oncogène cellulaire homologue de l'oncogène *v-abl* porté par le virus leucémique murin Abelson. Le gène *c-abl* code pour une tyrosine kinase non couplée à un récepteur qui semble être impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, dans la réponse à certains stress génotoxiques et dans la signalisation intracellulaire via les intégrines ⁴⁴⁻⁴⁶. La protéine *bcr*, comme *abl*, est exprimée ubiquitairement mais son rôle au niveau cellulaire n'est pas clairement déterminé. Par contre, certains indices pourraient laisser croire à une fonction au niveau de la transduction du signal dans la cellule ⁴⁵.

La protéine chimérique *bcr-abl* est une tyrosine kinase cytoplasmique constitutivement active ayant une activité de plusieurs fois supérieure à celle de la protéine normale *abl* ⁴². Cette protéine de fusion peut être de 190 kd (p190), 210 kd (p210) ou de 230 kd (p230) selon la longueur de la partie du gène *bcr* fusionné à *abl*. C'est la forme p210 qui est généralement associée à la LMC ^{44, 45, 47}. Daley *et al.* ont démontré que des cellules de moelle osseuse murine infectées par un rétrovirus codant pour p210 et transplantées chez des souris mènent au développement d'un syndrome myéloprolifératif semblable à la LMC humaine. Ainsi, *bcr-abl* peut causer la transformation néoplasique ⁴⁸.

Le mécanisme menant à la transformation néoplasique par la protéine chimérique *bcr-abl* est un processus complexe impliquant plusieurs interactions moléculaires. *Bcr-abl* peut activer plusieurs voies de signalisation intracellulaire telles que les voies JAK-STAT kinase, PI-3 kinase (PI : phosphatidyl inositol) et *ras* qui active les MAP (mitogen activated protein) et les SAP (stress activated protein) kinases ^{42, 45}. La voie de *ras* semble critique dans le mécanisme de transformation par *bcr-abl* puisque si cette

voie est bloquée, bcr-abl perd son pouvoir transformant ⁴⁹. Il a aussi été démontré que l'oncogène *c-myc* est essentiel à la transformation par bcr-abl ⁵⁰ et il semblerait que cette activation se fasse de façon indépendante de la voie ras ⁵¹.

La LMC progresse par trois phases de plus en plus agressives et résistantes aux traitements : la phase chronique, la phase accélérée et la phase aiguë. Au moment du diagnostic, la plupart des patients sont en phase chronique et sont souvent asymptomatiques. Les mécanismes impliqués dans l'évolution vers les phases accélérée et aiguë sont encore peu connus; il est possible que la présence d'autres anomalies dans la cellules favorise la progression vers ces phases. En général, la phase accélérée est caractérisée par des anomalies cytogénétiques autres que le chromosome de Philadelphie et une progression plus agressive de la maladie. Enfin la phase aiguë est caractérisée par la présence de 20-30% et plus de blastes dans le sang périphérique ou la moelle osseuse ^{42, 43}.

Les traitements standards pour la LMC incluent les greffes de moelle osseuse et les traitements à base d'hydroxyurée, de busulfan ou d'interféron- α . Les greffes de moelle osseuse offrent les meilleures chances de rémission. Malheureusement, les limitations dues à l'âge et à la difficulté de trouver des donneurs compatibles restreint le nombre de patients qui peuvent y avoir recours. L'hydroxyurée et le busulfan permettent de contrôler la leucocytose, mais ne retardent pas la progression vers la phase aiguë. Au contraire, l'interféron- α augmente la survie lorsqu'il est administré pendant la phase chronique, mais plusieurs patients (jusqu'à 20%) ne le tolèrent pas. Plus récemment, l'amélioration des connaissances de la biologie moléculaire de la LMC a permis le développement d'un inhibiteur de tyrosine kinase spécifique à bcr-abl, le mésylate d'imatinib. Les essais cliniques de phase III ont démontré que le mésylate d'imatinib permet d'obtenir une meilleure réponse cytogénétique qu'une combinaison interféron- α et cytarabine. La FDA américaine et Santé Canada ont approuvé le mésylate d'imatinib pour les patients en phase chronique qui sont résistants ou ne tolèrent pas l'interféron- α , ainsi que les patients en phase accélérée et aiguë ^{40, 43, 52}. Par contre, malgré ces résultats prometteurs, plusieurs cas de résistance au mésylate d'imatinib ont

déjà été documentés indiquant la nécessité de développer d'autres outils thérapeutiques ⁴⁰.

1.3 Greffes de moelle osseuse et techniques de purges

L'allogreffe de moelle osseuse peut induire une guérison de la LMC ^{40, 43}. Les effets anti-tumoraux de la greffe sont en partie dus aux traitements intensifs de chimiothérapie ou de radiothérapie pré-greffe, mais aussi à la greffe elle-même via les cellules T qui peuvent éliminer les cellules leucémiques résiduelles (effet greffon contre leucémie); cet effet est lié à la réaction de greffe contre hôte (GvH) ^{53, 54}. À cause de certaines limitations, les greffes allogéniques ne font pas partie des options de traitement de plusieurs patients : chez les patients âgés un fort taux de mortalité est associé à la greffe (30-50%) et chez les plus jeunes, la difficulté de trouver des donneurs compatibles en limite l'accessibilité ^{43, 55, 56}. Les récentes améliorations du typage HLA (human leucocyte antigen) et de la prophylaxie des infections et de la GvH permettent maintenant d'obtenir de bons résultats lorsque le donneur n'est pas de la famille du patient augmentant ainsi la possibilité de trouver des donneurs compatibles ⁴⁰.

Dans les cas où il n'y a aucune possibilité de greffe allogénique, les greffes autologues peuvent devenir une alternative intéressante. De plus, ces greffes peuvent être effectuées chez des patients plus âgés que les greffes allogéniques à cause de l'absence de GvH ⁵⁷. Par contre, des risques de rechute plus élevés ont été associés aux greffes autologues. Ces risques peuvent être attribués à plusieurs facteurs tel que la présence de cellules leucémiques dans le greffon. En effet, il a été démontré que la moelle osseuse de patients en rémission peut contenir une grande quantité de cellules leucémiques. Pour cette raison plusieurs techniques de purge de moelle osseuse ont été étudiées ^{53, 56}.

La méthode de purge *ex vivo* la plus commune est l'incubation avec des agents chimiothérapeutiques tel que le 4-hydroperoxycyclophosphamide (4-HC) ^{53, 57}. Dans une étude clinique portant sur 10 patients atteints de LMC, 6 patients ont présenté une rémission cytogénétique complète d'une durée moyenne de 6,5 mois suite à une greffe

autologue purgée avec le 4-HC. Après 16 mois de suivi, 5 de ces 6 patients étaient passés en phase aiguë de LMC ^{55, 58}. Même si les études cliniques suggèrent que les moelles purgées avec des agents chimiothérapeutiques ont un avantage par rapport aux moelles non purgées, cette méthode ne démontre pas de spécificité envers les cellules leucémiques et il semblerait qu'elle ne permette pas une inhibition complète de la division des myeloblastes leucémiques ⁵⁷.

La purge de moelle osseuse médiée par des anticorps (Ac) peut aussi être utilisée pour éliminer les cellules leucémiques de la moelle osseuse (sélection négative) ou pour sélectionner les cellules normales (sélection positive). Dans le cas de la sélection négative, les Ac doivent être dirigés contre des antigènes spécifiques aux cellules malignes, par exemple des Ac anti-(CALLA) ont été utilisés pour purger la moelle osseuse d'enfants atteints de LLA. Ces Ac sont généralement couplés à des toxines ou à des billes magnétiques pour permettre d'éliminer les cellules reconnues par ceux-ci. Cette méthode est cependant limitée par l'hétérogénéité antigénique des cellules malignes ⁵⁷. La sélection positive dépend aussi des antigènes présents à la surface des cellules malignes. Par exemple, des Ac anti-CD34 peuvent être utilisés dans des cas de cancer du sein métastatiques, mais ne peuvent pas être utilisés lorsque la lignée myéloïde est atteinte tel que dans les LMC ^{57, 59}.

La TPD a également été étudiée pour la purge de moelle osseuse. Daziano *et al.* ont démontré *in vitro* que la TPD avec l'AlPc permettait l'élimination sélective des cellules de LMA lorsque celles-ci étaient mélangées à des cellules normales ⁶⁰. Des études précliniques ont démontré que la TPD utilisant un dérivé de rhodamine, le 4,5-dibromorhodamine 123, cause une élimination sélective des cellules leucémiques dans des échantillons de patients atteints de CML et ce protocole est présentement sous étude clinique ^{61, 62}. La merocyanine 540 est un autre photosensibilisateur sous étude clinique pour la purge de moelle osseuse et il a été démontré *in vitro* qu'il affecte davantage les cellules de LMA et de LLA que les cellules normales de moelle osseuse suite à la TPD ^{63, 64}.

Plusieurs autres techniques de purge *ex vivo* ont aussi été étudiées, par exemple la culture à long terme qui permettrait d'éliminer les cellules Ph⁺, l'utilisation

d'oligonucléotides antisens contre la jonction bcr-abl et l'activation des cellules effectrices de la moelle osseuse par l'interleukine-2 ^{55, 57, 65}.

Malgré les efforts de recherche des dernières années, aucune méthode de purge ne s'est avérée parfaite. Un agent idéal pour la purge de moelle osseuse serait caractérisé par une forte sélectivité pour les cellules malignes avec une toxicité minimale pour les cellules souches et progénitrices. De plus, elle devrait être efficace contre les cellules résistantes aux autres types de traitements ⁶⁶.

1.4 Hypothèse

L'accumulation sélective par les tumeurs lorsque le TBO est utilisé pour la détection de carcinomes asymptomatiques ²⁵ suggère qu'il pourrait y avoir une sélectivité d'absorption par les cellules leucémiques par rapport aux cellules normales.

De plus, la TBO-TPD induit l'apoptose des cellules Jurkat, une ligné cellulaire leucémique ³⁵ suggérant une application possible pour l'élimination de cellules leucémiques.

Nous avons donc émis l'hypothèse que TBO-PDT induit une phototoxicité plus importante pour les cellules leucémiques K562 que pour les cellules de moelle osseuse normales. Le cas échéant cette découverte pourrait mener à une application possible pour la purge de moelle osseuse *ex vivo*.

Chapitre 2 : Article

**Photodynamic therapy with toluidine blue induces a similar reduction
in cell viability in K562 and normal bone marrow cells**

Sylvie Dussault, Gilles Viau, Robert Bissonnette

2.1 Abstract

Toluidine blue (TBO) is a thiazine dye that has been used as an aid for the detection of oral cavity cancer. It was recently demonstrated that photodynamic therapy (PDT) with TBO was cytotoxic to Jurkat cells with induction of apoptosis following light exposure. In this study the effects of TBO-PDT on K562 leukemia cell line and normal bone marrow (NBM) cells were compared in order to explore the possibility of developing TBO-PDT as a bone marrow purging technique. Spectrofluorometric analysis showed that K562 cells accumulate up to 6.7 times more TBO than NBM cells after a 30 minutes incubation with 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. TBO accumulation in K562 cells was already maximal at 10 minutes and this level was maintained for up to 2 hours. Clonogenic assays showed a similar reduction in survival of K562 cells and NBM cells. TBO-PDT induced a significant decrease in survival of K562 and NBM cells with TBO concentrations as low as 0,15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Intracellular localization studies with organelle specific dyes showed that TBO localizes to the lysosomes and endoplasmic reticulum in K562 cells. In conclusion survival of K562 and NBM cells was similar following TBO-PDT suggesting that TBO-PDT cannot be used as a bone marrow purging agent under the current experimental conditions.

2.2 Introduction

Chronic myelogenous leukemia (CML) results from the transformation and clonal expansion of a pluripotent stem cell present mainly in the bone marrow (1). CML accounts for 20% of all leukemia cases with an annual incidence of 1-1.5 cases per 100000 (2). Therapeutic options for CML include stem cell transplantation and nontransplant therapies such as interferon- α and imatinib mesylate (2-4). Allogeneic stem cell transplantation can potentially be curative but limitations such as age and availability of HLA-matched donors restricts the number of potentially eligible patients (3). A possible solution to this problem is autologous transplantation. However the presence progenitor cells with the Philadelphia chromosome, a cytogenetic abnormality seen in 95% of CML patients, in the graft could contribute to a relapse of the disease (5). For this reason, bone marrow purging techniques are currently under investigation.

Photodynamic therapy (PDT) is based on the administration of a photosensitizer followed by its subsequent activation by light irradiation. Toluidine blue (TBO) is a cationic dye of the phenothiazine family which has been used for many years as an aid in the detection of squamous cell carcinomas of the oral cavity (6, 7). Its potential as a photosensitizer has been demonstrated by the phototoxic effects on various pathogens such as *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* (8-11). Recently we demonstrated that TBO-PDT was cytotoxic to Jurkat cells, a human T-cell leukemia cell line, with an increase in caspase-3 like activity, DNA fragmentation and apoptosis induction following light exposure (12). These findings suggest that TBO-PDT might be used as a bone marrow purging technique.

In the current study we compared the phototoxic properties of TBO-PDT in K562 cells (a CML cell line) and human bone marrow cells. In order to achieve this objective, the relative amount of TBO absorbed by a CML cell line and the survival of this cell line following TBO-PDT was compared to that of normal bone marrow cells (NBM). The intracellular localization of TBO was determined at the time of exposure for the leukemic cell line in order to optimize the conditions of PDT.

2.3 Material and methods

Chemicals and reagents. All experiments were performed with Toluidine blue O (TBO) basic blue 17 (Sigma, St-Louis, MO). TBO stock solution of 1 mg/mL in PBS pH 7.4 was prepared and kept at 4°C in the dark. LysoTracker Yellow HCK-123 (LT; peak absorption (abs): 465 nm, peak emission (em): 535 nm), MitoTracker Green FM (MT; abs: 490 nm, em: 513 nm), BODIPY FL C₅-Ceramide complexed with BSA (BFLC; abs: 505 nm, em: 620 nm) and ER-Tracker Blue-White DPX (ERT; abs: 374 nm, em: 430-640 nm) were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). Cell culture ware was from Nunc (Nalge Nunc International, Rochester, NY) and cell culture media were bought from Gibco (Invitrogen, Burlington, ON, Canada).

Cell culture. The K562 (chronic myelogenous leukemia; bone marrow) cell line was a gift from Xiaodvan Weng (Hemato-Oncology Department, University of Montreal Hospital Centre). Cells were kept in RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640 media; Gibco) containing 10% certified fetal bovine serum (FBS; Gibco) and 1% penicillin/streptomycin (p/s; Gibco).

Isolation of mononuclear cells from bone marrow sample. Mononuclear cells were isolated as previously described (13). In detail, the bone marrow samples from non-leukemic donors were collected in sodium heparin tubes. The samples were subsequently diluted 1 in 2 in a washing solution (Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM; Gibco) with 2% FBS and 1% p/s). Following a 10 minutes centrifugation at 400g, the leucocytic fraction was recovered, diluted in 4 mL of washing solution and carefully put on 3 mL of Ficoll-Paque PLUS (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden). After a 30 minutes centrifugation at 400g without brakes, the mononuclear cells were carefully removed, washed twice with the IMDM washing solution and counted. The cells were kept in IMDM, 10% FBS, 1% p/s for 24 hours prior to experimentation.

Quantification of intracellular TBO accumulation. The cells were incubated in their respective media containing 0.5% FBS for 24 hours before the incubation with TBO. The cells were then incubated with 2 µg/mL of TBO for different times (0, 10, 20, 30, 60, 90 and 120 minutes) at 37°C in the dark. After this incubation, 8×10^5 cells were centrifuged, washed and resuspended in 2 mL of PBS pH 7.4 (Gibco). The relative amount of TBO

contained in the cells was measured with a luminescence spectrometer LS 50 B (Perkin Elmer, Norwalk, CT). The excitation was set at 630 nm and the peak emission detected at 665 nm. Each experiment was repeated at least 5 times.

Intracellular localization studies. Twenty-four hours prior to experimentation, the cells were starved in RPMI media containing 0.5% FBS and 1% p/s. For all localization assays, the K562 cells were incubated with 2.0 µg/mL of TBO for 1h at 37°C and either LT, MT, BFLC or ERT. The LT, MT and ERT staining were all for 30 minutes with a concentration of 150 nM, 100 nM and 500 nM respectively and performed in the last half hour of the TBO incubation. For the BFLC staining, the cells were incubated at 4°C for 30 minutes in Hank's buffer containing 5 µM BFLC, followed by a 1 hour incubation at 37°C with TBO in RPMI medium without BFLC. Images were generated with a Nikon Optiphot-2 microscope equipped with a thermoelectrically cooled CCD camera (Model DC330E, Dage-MTI Inc, Michigan city, IN) hooked up to a PC computer. For MT and LT fluorescent images, a bandpass 450-490 nm excitation filter and a 520 nm long-pass emission filter (BA520) (Nikon, Japan) were used. For BFLC images a bandpass 450-490 nm excitation filter (Nikon) and a 607-662 nm bandpass emission filter (635DF55; Omega Optical, Brattleboro, VT) were used and for ERT fluorescent images a 373-401 nm bandpass excitation filter (387AF28) and a 435 nm long-pass emission filter (Omega Optical) were used. All images were analyzed with Clemex vision software (Version 3.0.036, Longueuil, QC, Canada). A composite image was also generated by transferring the blue areas of TBO localization onto the corresponding fluorescence image of the dye (MT, LT, BFLC or ERT) using pink as a false color. All images chosen were the most representative of many experiments.

Photodynamic Therapy (PDT). Before experimentation, the cells were incubated in their respective media (RPMI or IMDM) containing 0.5% FBS and 1% p/s for 24 hours. Cells, at a concentration of 2.5×10^5 cells/mL, were then incubated with different concentrations of TBO (0.0 to 1.0 µg/mL) for 1 hour at 37°C. All manipulations following TBO addition were performed in the dark. After TBO incubation, cells were exposed to 11.68 J/cm² of white light from an unfiltered Kodak slide projector (Kodak carousel 650 H, Toronto, ON, Canada) at an irradiance of 1.4 to 2.3×10^{-2} w/cm². The irradiance was measured before

each experiment with an IL700 radiometer (International Light, Newburyport, MA) equipped with a SED033 #6243 detector and F#21186, CB248 #21343 and W#9338 filters.

Clonogenic Assays. Following PDT cells were immediately diluted in IMDM and subsequently diluted 1 in 10 in a mixture of 2.6% methylcellulose, 30% FBS, 1% BSA, 2 mM L-glutamine and 10^{-4} M 2-Mercaptoethanol in IMDM for K562 cells (Methocult H4230, Stemcell Technologies, Vancouver, BC, Canada) or in a mixture of 2.6% methylcellulose, 30% FBS, 1% BSA, 2 mM L-glutamine, 10^{-4} M 2-Mercaptoethanol, 50 ng/mL rh Stem Cell Factor, 10 ng/mL rh GM-CSF and 10 ng/mL IL-3 for NBM cells (Methocult GF H4534, Stemcell Technologies). A volume of 1.0 mL of this cell/methylcellulose mixture was then plated in 35 mm petri dishes (Nunc) in order to obtain 200, 2000 or 20000 cells (K562) and $0,1 \times 10^6$ or 1×10^6 cells (NBM) per petri dish. Three mL syringes with a blunt 16G needle (Sherwood Medical company, St-Louis, MO) were used for the plating. Cells were subsequently incubated for 2 weeks at 37°C, 5% CO₂ and 100% humidity and colonies of more than 40 cells were counted with a Nikon Optiphot-2 microscope at a magnification of 20x. Each experiment was repeated 3 times in quadruplicates (K562) or duplicates (NBM).

Statistical Analysis. A Two Way ANOVA test was used for the analysis of TBO absorption and multiple comparison was performed using the Student-Newman-Keuls method. For clonogenic assays an ANOVA on repeated measurements was performed and multiple comparison was done using the Tukey-Kramer adjustment. A p value of < 0.05 was considered statistically significant.

2.4 Results

2.4.1 Absorption of TBO

Following incubation of K562 cells with 2.0 µg/mL of TBO, spectrofluorometry data showed a significant increase in TBO fluorescence intensity after only 10 minutes ($p < 0.05$) (Figure 1). TBO fluorescence also increased in NBM cells after TBO addition but this was not statistically significant. However there was a significant difference between K562 and NBM cells in the relative amount of TBO absorbed (Figure 1) ($p < 0.05$). The maximum K562/NBM TBO ratio was 6.7 and was reached at 30 min.

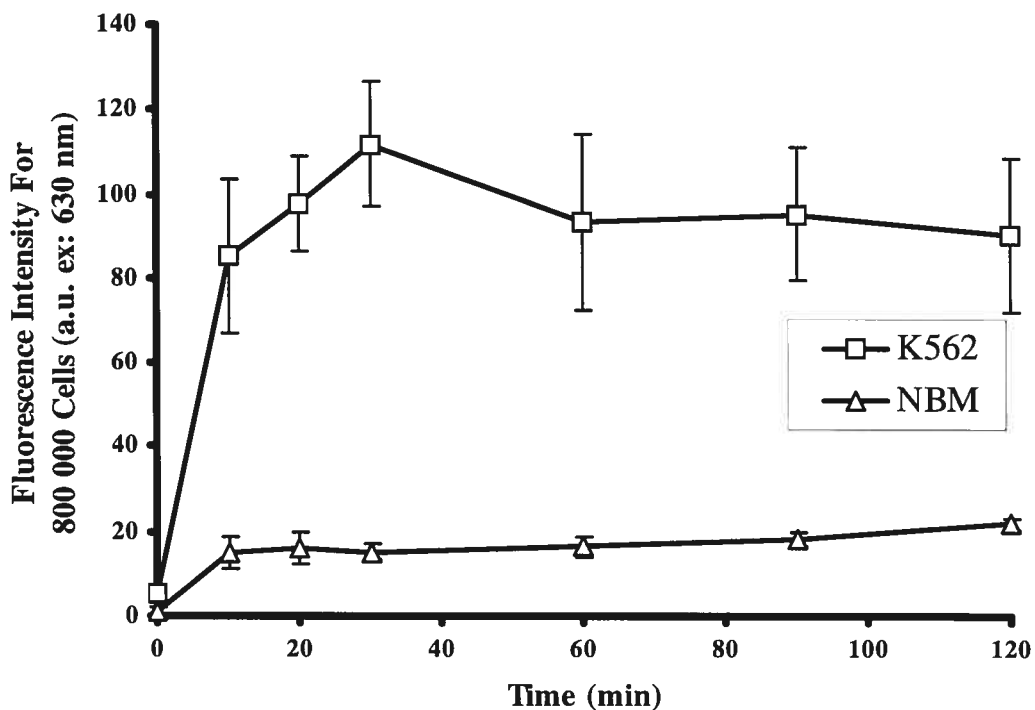


Figure 1. TBO absorption by K562 and NBM cells. The relative amount of TBO in the two cell types was measured by spectrofluorometry. Cells were incubated for different times (0-2 hours) with 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of TBO. Data represented are the mean of 5 experiments. ($\pm\text{SD}$)

2.4.2 Intracellular localization of TBO

Intracellular localization of TBO after a 1 hour incubation showed a different pattern between K562 and NBM cells under standard light microscopy (Figure 2). In NBM cells TBO was present in a diffuse manner in the cytoplasm whereas in the K562 cell line TBO was always localized to a limited area in the cytoplasm.

Intracellular localization studies showed that after co-incubation of K562 cells with TBO and MT or BFLC no overlap was observed between the localization of TBO and of these mitochondrial and Golgi dyes. However, there was an overlap between the TBO localization and the lysosomal dye LT and the endoplasmic reticulum (ER) dye ERT (Figure 3).

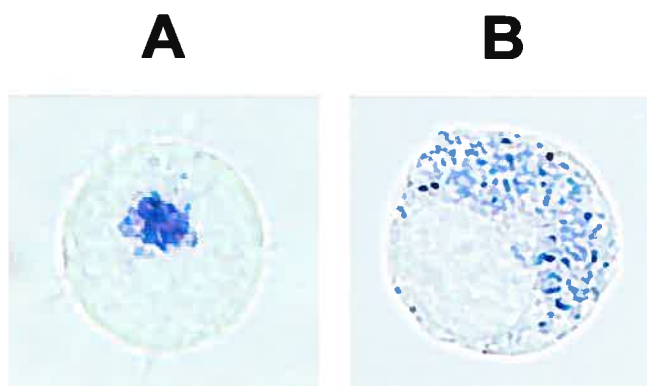


Figure 2. Different TBO distribution pattern in K562 and NBM cells. Light microscopy photograph of K562 (A) and NBM cells (B) incubated 1 hour with 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of TBO.

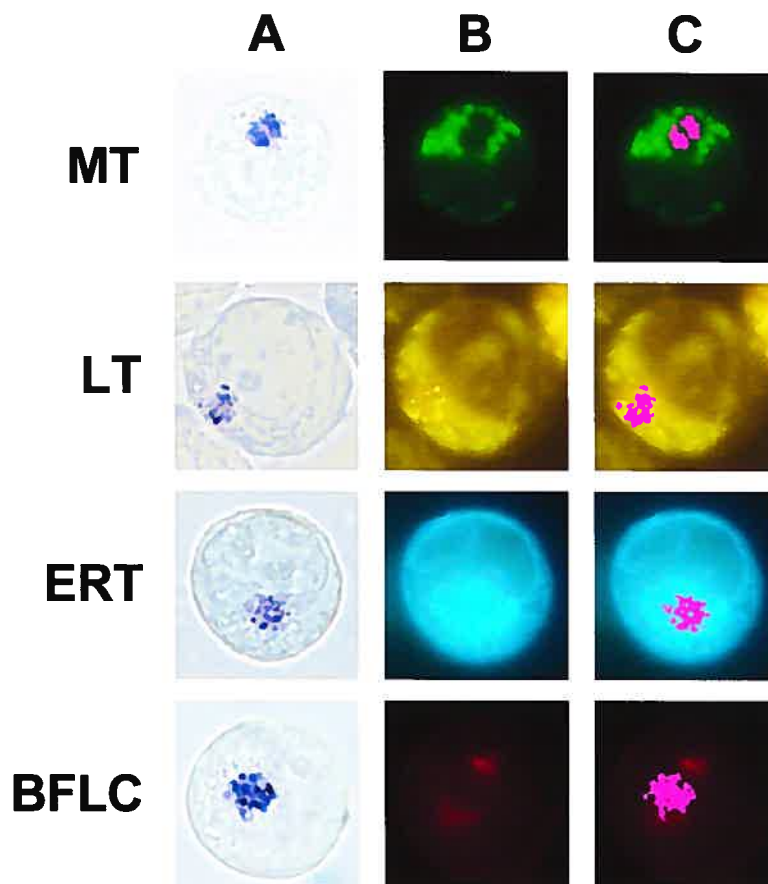


Figure 3. Intracellular localization of TBO in K562 cells. Fluorescent microscopy of K562 cells incubated for 1 hour with 2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of TBO and dyes specific to 4 different subcellular structures: MitoTracker (MT), LysoTracker (LT), BODIPY-FL C₅-Ceramide (BFLC) and ER-Tracker (ERT). Column A: Photograph under light microscopy of K562 cells with TBO. Column B: Same cell as in column A viewed under fluorescence microscopy to visualise MT, LT, BFLC or ERT. Column C: Composite image of TBO localization generated by transferring the blue color of TBO seen in column A onto the corresponding fluorescence image seen in column B. Pink is used as false color to indicate localization of TBO.

2.4.3 Cytotoxicity of TBO-PDT on K562 and NBM cells

Clonogenic assays were performed in order to evaluate the phototoxic effects of TBO-PDT on K562 and NBM cells. In all experiments light alone had no effect on clonogenicity (Figure 4). For both K562 and NBM cells there was a mild but significant reduction in clonogenicity when cells were incubated with TBO in the absence of light (K562 $p=0.048$; NBM $p=0.0077$). For K562 and NBM cells a significant decrease in clonogenicity was observed following TBO-PDT as compared to cells incubated with TBO and not exposed to light (Figure 4). This was significant ($p<0.05$) at all TBO concentrations except 0.01 $\mu\text{g/mL}$ TBO for K562 cells. For K562 cells, colonies were not detectable when PDT was performed with 2.0 $\mu\text{g/mL}$ of TBO whereas for NBM cells colonies were not detected when PDT was performed with 1.0 $\mu\text{g/mL}$. The survival curve of K562 cells was similar to the survival curve of NBM cells following TBO-PDT.

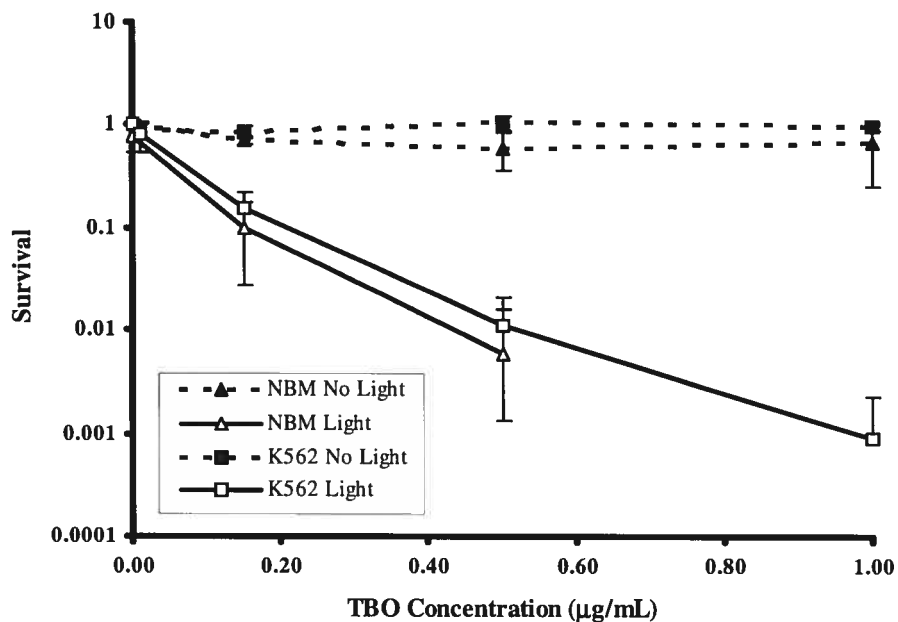


Figure 4. Cytotoxicity of TBO-PDT on K562 and NBM cells. TBO-PDT was performed with TBO concentrations from 0.01 to 1.0 µg/mL and from 0.15 to 1.0 µg/mL for K562 and NBM cells respectively with 11.68 J/cm² of white light. Cytotoxicity was assessed by clonogenic assays performed immediately after TBO-PDT. Survival is expressed as a proportion of clonogenicity of treated cells to clonogenicity of control cells without TBO and not exposed to light. Data represented are the mean of 3 experiments performed in quadruplicates (K562) or duplicates (NBM). (\pm SD)

2.5 Discussion

Photosensitizers previously studied as potential bone marrow purging agents include rhodamine derivatives, merocyanine 540, benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD-MA) and Victoria blue (14-17). BPD-MA has been shown to accumulate almost 3 times more in a multiple myeloma cell line than in NBM cells (14) and about 10 times more in K562 than in NBM cells (18). The selective accumulation of merocyanine 540 has been reported to be between 4 to 5 fold higher in leukemic cells as compared to normal leukocytes (19, 20). To our knowledge no comparative uptake studies between leukemic and normal cells have been published for rhodamine derivatives or Victoria blue. In this study it was observed that K562 cells accumulated up to 6.7 times more TBO than NBM cells which is less than what has been reported for BPD-MA in K562 cells (14) but in the order of what has been reported for merocyanine 540. In this latter case a 5 fold difference in merocyanine 540 accumulation was enough for selective reduction in viability following PDT (19).

The absence of selective reduction in viability with TBO-PDT could be related to the intracellular localization of the photosensitizer. Because of the limited migration potential of reactive oxygen species, the initial site of photodamage is closely related to the localization of the photosensitizer which has a strong impact on phototoxicity and the extent of the apoptosis response following light exposure (21, 22). Kessel and Luo (23) have shown that photosensitizers localised to the mitochondria such as porphycene monomer induce rapid apoptosis upon irradiation, whereas those that bind plasma membrane such as monocationic porphyrin or that bind lysosomes such as lysyl chlorin p6 kill less efficiently. In the latter case delayed apoptosis induction or the activation of a non-apoptotic pathway is triggered (23, 24). We observed that TBO localises to the lysosomes and ER in the K562 cell line. We previously reported a similar intracellular localization for TBO in the Jurkat cell line. TBO-PDT in this cell line was associated with apoptosis induction as early as 2 hours after light exposure (12). Victoria blue and BPD-MA have been reported to localise to the mitochondria (25, 1990, 26) and merocyanine 540 to the outer plasma membrane in leukemic and NBM cells (20, 27). These differences in intracellular localisation may be associated with a different effect

of PDT on leukemic and normal cells. To our knowledge, the intracellular localization of Victoria blue and BPD-MA has not been studied in NBM cells.

In conclusion we observed a similar reduction in cell viability in K562 and NBM cells following TBO-PDT. The absence of selective phototoxicity in K562 cells suggests that TBO-PDT can not be used as a bone marrow purging agent under the current experimental conditions.

Acknowledgments--This work has been supported in part by the University of Montreal Hospital Center Foundation.

2.6 References

1. Mauro, MJ and BJ Druker (2001) Chronic myelogenous leukemia. *Current Opinion in Oncology*, **13**, 3-7.
2. O'Dwyer, ME, MJ Mauro and BJ Druker (2002) Recent advancements in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Annual Review of Medicine*, **53**, 369-81.
3. Kalidas, M, H Kantarjian and M Talpaz (2001) Chronic myelogenous leukemia. *Jama*, **286**, 895-8.
4. Lee, SJ (2000) Chronic myelogenous leukaemia. *British Journal of Haematology*, **111**, 993-1009.
5. Reiffers, J, FX Mahon, JM Boiron, C Faberes, G Marit, P Cony-Makhoul and A Broustet (1996) Autografting in chronic myeloid leukemia: an overview. *Leukemia*, **10**, 385-8.
6. Herlin, P, J Marnay, JH Jacob, JM Ollivier and AM Mandard (1983) A study of the mechanism of the toluidine blue dye test. *Endoscopy*, **15**, 4-7.
7. Eliezri, Y (1988) The toluidine blue test: an aid in the diagnosis and treatment of early squamous cell carcinomas of mucous membranes. *Journal of the American Academy of Dermatology*, **18**, 1339-49.
8. Wilson, M and N Mia (1993) Sensitisation of *Candida albicans* to killing by low-power laser light. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, **22**, 354-7.

9. Sarkar, S and M Wilson (1993) Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis. *Journal of Periodontal Research*, **28**, 204-10.
10. Millson, CE, M Wilson, AJ MacRobert, J Bedwell and SG Bown (1996) The Killing of Helicobacter Pylori By Low-Power Laser Light in the Presence of a Photosensitiser. *Journal of Medical Microbiology*, **44**, 245-252.
11. Burns, T, M Wilson and GJ Pearson (1993) Sensitisation of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser. *Journal of Medical Microbiology*, **38**, 401-5.
12. Tremblay, JF, S Dussault, G Viau, F Gad, M Boushira and R Bissonnette (2002) Photodynamic therapy with toluidine blue in Jurkat cells: cytotoxicity, subcellular localization and apoptosis induction. *Photochemical and Photobiological Sciences*, **1**, 852-6.
13. Arkin, S, B Naprstek, L Guarini, S Ferrone and JM Lipton (1991) Expression of intercellular adhesion molecule-1 (CD54) on hematopoietic progenitors. *Blood*, **77**, 948-53.
14. Gluck, S, A Chadderton and AD Ho (1996) The selective uptake of benzoporphyrin derivative mono-acid ring A results in differential cell kill of multiple myeloma cells in vitro. *Photochemistry & Photobiology*, **63**, 846-53.
15. Fiedorowicz, M, A Pituch-Noworolska and M Zembala (1997) The photodynamic effect of Victoria blue BO on peripheral blood mononuclear and leukemic cells. *Photochemistry & Photobiology*, **65**, 855-61.
16. Mulrone, CM, S Gluck and AD Ho (1994) The use of photodynamic therapy in bone marrow purging. *Seminars in Oncology*, **21**, 24-7.
17. Villeneuve, L (1999) Ex vivo photodynamic purging in chronic myelogenous leukaemia and other neoplasias with rhodamine derivatives. *Biotechnology & Applied Biochemistry*, **30**, 1-17.
18. Jamieson, CH, WN McDonald and JG Levy (1990) Preferential uptake of benzoporphyrin derivative by leukemic versus normal cells. *Leukemia Research*, **14**, 209-19.
19. Valinsky, JE, TG Easton and E Reich (1978) Merocyanine 540 as a fluorescent probe of membranes: selective staining of leukemic and immature hemopoietic cells. *Cell*, **13**, 487-99.
20. Atzpodi, J, SC Gulati and BD Clarkson (1986) Comparison of the cytotoxic effects of merocyanine-540 on leukemic cells and normal human bone marrow. *Cancer Research*, **46**, 4892-5.

21. Dougherty, TJ, CJ Gomer, BW Henderson, G Jori, D Kessel, M Korbelik, J Moan and Q Peng (1998) Photodynamic therapy. *Journal of the National Cancer Institute*, **90**, 889-905.
22. Oleinick, NL, RL Morris and I Belichenko (2002) The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. *Photochemical and Photobiological Sciences*, **1**, 1-21.
23. Kessel, D and Y Luo (1998) Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. *Journal of Photochemistry & Photobiology. B - Biology*, **42**, 89-95.
24. Kessel, D, Y Luo, Y Deng and CK Chang (1997) The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy. *Photochemistry & Photobiology*, **65**, 422-6.
25. Modica-Napolitano, JS, JL Joyal, G Ara, AR Oseroff and JR Aprille (1990) Mitochondrial toxicity of cationic photosensitizers for photochemotherapy. *Cancer Research*, **50**, 7876-81.
26. Granville, DJ, DO Ruehlmann, JC Choy, BA Cassidy, DW Hunt, C van Breemen and BM McManus (2001) Bcl-2 increases emptying of endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores during photodynamic therapy-induced apoptosis. *Cell Calcium*, **30**, 343-50.
27. Kessel, D and Y Luo (2001) Intracellular sites of photodamage as a factor in apoptotic cell death. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **5**, 181-184.

Chapitre 3 : Discussion et conclusions

Des PS tels que des dérivés de la rhodamine, la merocyanine 540, le BPD-MA et le bleu Victoria ont déjà été étudiés précédemment comme agents potentiels pour la purge de moelle osseuse ^{60, 61, 66-68}. L'accumulation intracellulaire de BPD-MA est environ 3 fois plus importante pour les cellules de myélome multiple que pour les monocytes de moelle osseuse normale ⁶⁷ et environ 10 fois plus pour les cellules K562 que pour les cellules normales de moelle osseuse ⁶⁹. Pour la merocyanine 540, l'accumulation préférentielle par les cellules leucémiques semble être de 4 à 5 fois celles des cellules normales ^{64, 70}. Pour les dérivés de la rhodamine et le bleu Victoria des études comparatives d'absorption entre cellules normales et leucémiques n'ont pas été faites. Nous avons observé un ratio d'absorption K562/moelle osseuse atteignant 6,7 à 30 minutes. Ce ratio est moindre que ce qui a été observé avec le BPD-MA dans les cellules K562, mais comparable à ce qui a été observé pour le merocyanine 540. Dans ce dernier cas un ratio de 5 fois était suffisant pour induire une cytotoxicité sélective suite à la TPD ⁷⁰.

En général la sélectivité de la TPD est due à une accumulation préférentielle du PS par les cellules et tissus tumoraux par rapport aux cellules et tissus normaux environnants ⁴. Cette sélectivité peut-être augmentée par une exposition sélective de la tumeur à la lumière ⁴. Bien entendu, il est impossible d'exposer sélectivement les cellules malignes dans une suspension cellulaire contenant des cellules normales. Donc, dans le cas de la purge de moelle osseuse, c'est principalement l'accumulation sélective du PS qui importe.

Par contre, nous avons observé une différence dans le patron de distribution intracellulaire du TBO entre les cellules K562 et les cellules normales de moelle osseuse, ce qui suggère une différence au niveau de la localisation intracellulaire du TBO. Puisque le potentiel de migration des ROS est limité, le site initial du photodommage dépend de la localisation intracellulaire du PS et a un impact sur la phototoxicité et le degré d'induction de l'apoptose ^{6, 7}. Ainsi, une différence de localisation intracellulaire aurait pu augmenter la sélectivité. Par contre c'est aussi cette localisation intracellulaire du TBO qui pourrait expliquer l'absence de réduction sélective de la survie. Kessel et Luo ⁹ ont en fait démontré que les PS localisés à la

mitochondrie comme le PcM (porphycene monomer) induisant l'apoptose rapidement après l'irradiation. Au contraire, les PS qui se lient aux membranes plasmiques ou aux lysosomes tels que le MCP (monocationic porphyrin) et le LCP respectivement induisent moins efficacement la mort cellulaire et l'apoptose ^{9, 18}. Dans notre étude, nous avons démontré que, dans les cellules K562, le TBO se localise préférentiellement aux lysosomes et au réticulum endoplasmique.

Les expériences de colocalisation avec les marqueurs spécifiques aux différentes organelles (mitochondries, lysosomes, appareil de Golgi et réticulum endoplasmique) ont été répétées plusieurs fois. C'est uniquement avec les marqueurs des lysosomes et du réticulum endoplasmique qu'une colocalisation avec le TBO a été observée de façon constante. Par contre, la colocalisation observé dans ces cas n'était pas complète puisque le TBO ne couvre pas la totalité des lysosomes ou du réticulum endoplasmique, mais systématique puisque chaque fois cette co-localisation était observée.

Cette localisation est similaire à celle précédemment observé chez les cellules Jurkat. De plus dans cette lignée cellulaire la TBO-TPD a été associée à une induction de l'apoptose dès 2 heures après l'irradiation ³⁵. Il a été démontré que le bleu Victoria et le BPD-MA se localisent à la mitochondrie ^{10, 71} et la merocyanine 540 à l'extérieur de la membrane plasmique des cellules leucémiques et normales ^{15, 64}. Ces différences de localisation intracellulaire pourraient être associées aux différences de sélectivité de la TPD entre les cellules leucémiques et normales selon les PS. La localisation intracellulaire du BPD-MA et du bleu Victoria n'a pas été étudiée dans les cellules normales de moelle osseuse.

Malgré ces différences d'absorption et de patron de localisation intracellulaire entre les cellules K562 et les cellules normales de moelle osseuse, nous avons observé une phototoxicité similaire des cellules K562 et des cellules normales de moelle osseuse à la TPD avec le TBO. Puisqu'un bon agent pour la purge de moelle osseuse se définit comme étant fortement sélectif pour les cellules malignes avec une toxicité minimale pour les cellules normales ⁶⁶ l'absence de sélectivité suggère que la TBO-TPD ne peut pas être utilisée pour la purge de moelle osseuse dans ces conditions.

Références

1. Ackroyd, R, Kelty, C, Brown, N et Reed, M. *The history of photodetection and photodynamic therapy*, Photochemistry & Photobiology, 2001, **74**(5): 656-69.
2. Wilson, BC. *Photodynamic therapy for cancer: Principles*, Canadian journal of gastroenterology, 2002, **16**(6): 393-396.
3. Sharman, WM, Allen, CM et van Lier, JE. *Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications*, Drug Discovery Today, 1999, **4**(11): 507-517.
4. Macdonald, IJ et Dougherty, TJ. *Basic principles of photodynamic therapy*, Journal of porphyrins and Phthalocyanines, 2001, **5**: 105-129.
5. Allen, CM, Sharman, WM et van Lier, JE. *Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer*, Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 2001, **5**: 161-169.
6. Dougherty, TJ, Gomer, CJ, Henderson, BW, Jori, G, Kessel, D, Korbelik, M, Moan, J et Peng, Q. *Photodynamic therapy*, Journal of the National Cancer Institute, 1998, **90**(12): 889-905.
7. Oleinick, NL, Morris, RL et Belichenko, I. *The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how*, Photochemical and Photobiological Sciences, 2002, **1**: 1-21.
8. Granville, DJ, Carthy, CM, Jiang, H, Shore, GC, McManus, BM et Hunt, DW. *Rapid cytochrome c release, activation of caspases 3, 6, 7 and 8 followed by Bap31 cleavage in HeLa cells treated with photodynamic therapy*, FEBS Letters, 1998, **437**(1-2): 5-10.
9. Kessel, D et Luo, Y. *Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis*, Journal of Photochemistry & Photobiology. B - Biology, 1998, **42**(2): 89-95.
10. Granville, DJ, Ruehlmann, DO, Choy, JC, Cassidy, BA, Hunt, DW, van Breemen, C et McManus, BM. *Bcl-2 increases emptying of endoplasmic reticulum Ca²⁺ stores during photodynamic therapy-induced apoptosis*, Cell Calcium, 2001, **30**(5): 343-50.
11. Granville, DJ, Shaw, JR, Leong, S, Carthy, CM, Margaron, P, Hunt, DW et McManus, BM. *Release of cytochrome c, Bax migration, Bid cleavage, and activation of caspases 2, 3, 6, 7, 8, and 9 during endothelial cell apoptosis*, American Journal of Pathology, 1999, **155**(4): 1021-5.
12. Granville, DJ, Cassidy, BA, Ruehlmann, DO, Choy, JC, Brenner, C, Kroemer, G, van Breemen, C, Margaron, P, Hunt, DW et McManus, BM. *Mitochondrial*

- release of apoptosis-inducing factor and cytochrome c during smooth muscle cell apoptosis*, American Journal of Pathology, 2001, **159**(1): 305-11.
13. Granville, DJ, Jiang, H, McManus, BM et Hunt, DW. *Fas ligand and TRAIL augment the effect of photodynamic therapy on the induction of apoptosis in JURKAT cells*, International Immunopharmacology, 2001, **1**(9-10): 1831-40.
 14. Hengartner, MO. *The biochemistry of apoptosis*, Nature, 2000, **407**(6805): 770-6.
 15. Kessel, D et Luo, Y. *Intracellular sites of photodamage as a factor in apoptotic cell death*, Journal of Porphyrins and Phtlocyanines, 2001, **5**: 181-184.
 16. Kessel, D, Luo, Y, Mathieu, P et Reiners, JJ, Jr. *Determinants of the apoptotic response to lysosomal photodamage*, Photochemistry & Photobiology, 2000, **71**(2): 196-200.
 17. Moan, J, Berg, K, Anholt, H et Madslie, K. *Sulfonated aluminium phthalocyanines as sensitizers for photochemotherapy. Effects of small light doses on localization, dye fluorescence and photosensitivity in V79 cells*, International Journal of Cancer, 1994, **58**(6): 865-70.
 18. Kessel, D, Luo, Y, Deng, Y et Chang, CK. *The role of subcellular localization in initiation of apoptosis by photodynamic therapy*, Photochemistry & Photobiology, 1997, **65**(3): 422-6.
 19. Kochevar, IE, Bouvier, J, Lynch, M et Lin, CW. *Influence of dye and protein location on photosensitization of the plasma membrane*, Biochimica et Biophysica Acta, 1994, **1196**(2): 172-80.
 20. Kochevar, IE, Lambert, CR, Lynch, MC et Tedesco, AC. *Comparison of photosensitized plasma membrane damage caused by singlet oxygen and free radicals*, Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes, 1996, **1280**(2): 223-230.
 21. Korbelik, M. *Induction of tumor immunity by photodynamic therapy*, Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery, 1996, **14**(5): 329-34.
 22. Dougherty, TJ. *An update on photodynamic therapy applications*, Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery, 2002, **20**(1): 3-7.
 23. Bissonnette, R et Lui, H. *Current status of photodynamic therapy in dermatology*, Dermatological Clinics, 1997, **15**: 507-19.
 24. Eliezri, Y. *The toluidine blue test: an aid in the diagnosis and treatment of early squamous cell carcinomas of mucous membranes.*, Journal of the American Academy of Dermatology, 1988, **18**: 1339-49.

25. Herlin, P, Marnay, J, Jacob, JH, Ollivier, JM et Mandard, AM. *A study of the mechanism of the toluidine blue dye test*, Endoscopy, 1983, **15**(1): 4-7.
26. Sanchez, A, Guzman, A, Ortiz, A, Rembao, D, Espinosa, B, Zenteno, E et Guevara, J. *Toluidine blue-O staining of prion protein deposits*, Histochemistry & Cell Biology, 2001, **116**(6): 519-24.
27. Wilson, M. *Bactericidal effect of laser light and its potential use in the treatment of plaque-related diseases*, International Dental Journal, 1994, **44**(2): 181-9.
28. Millson, CE, Wilson, M, MacRobert, AJ, Bedwell, J et Bown, SG. *The Killing of Helicobacter Pylori By Low-Power Laser Light in the Presence of a Photosensitiser*, Journal of Medical Microbiology, 1996, **44**(4): 245-252.
29. Wilson, M et Mia, N. *Sensitisation of Candida albicans to killing by low-power laser light*, Journal of Oral Pathology & Medicine, 1993, **22**(8): 354-7.
30. Burns, T, Wilson, M et Pearson, GJ. *Sensitisation of cariogenic bacteria to killing by light from a helium-neon laser*, Journal of Medical Microbiology, 1993, **38**(6): 401-5.
31. Sarkar, S et Wilson, M. *Lethal photosensitization of bacteria in subgingival plaque from patients with chronic periodontitis*, Journal of Periodontal Research, 1993, **28**(3): 204-10.
32. Komerik, N, Curnow, A, MacRobert, AJ, Hopper, C, Speight, PM et Wilson, M. *Fluorescence biodistribution and photosensitising activity of toluidine blue O on rat buccal mucosa.*, Lasers in medical science, 2002, **17**: 86-92.
33. Darzynkiewicz, Z et Carter, SP. *Photosensitizing effects of the tricyclic heteroaromatic cationic dyes pyronin Y and toluidine blue O (tolonium chloride)*, Cancer Research, 1988, **48**(5): 1295-9.
34. Canete, M, Villanueva, A et Juarranz, A. *Uptake and photoeffectiveness of two thiazines in HeLa cells*, Anti-Cancer Drug Design, 1993, **8**(6): 471-7.
35. Tremblay, JF, Dussault, S, Viau, G, Gad, F, Boushira, M et Bissonnette, R. *Photodynamic therapy with toluidine blue in Jurkat cells: cytotoxicity, subcellular localization and apoptosis induction.*, Photochemical and Photobiological Sciences, 2002, **1**(11): 852-6.
36. Fisher, AM, Murphree, AL et Gomer, CJ. *Clinical and preclinical photodynamic therapy*, Lasers in Surgery & Medicine, 1995, **17**(1): 2-31.
37. Hoffbrand, AV et Pettit, JE, *Essential Haematology*. 3rd Edition, Blackwell science, 1998, Oxford: 209-50.

38. Cotran, RS, Kumar, V et Robbins, SL, *Robbins Pathologic basis of disease*. 5th Edition, W.B. Saunders Compagny, 1994, Philadelphia: 648-56.
39. Beers, MH et Berkow, R, *Manuel Merck de diagnostic et thérapeutique*. 3ième Édition, Edition du centenaire, 1999, Paris: 929-35.
40. O'Dwyer, ME, Mauro, MJ et Druker, BJ. *Recent advancements in the treatment of chronic myelogenous leukemia*, Annual Review of Medicine, 2002, **53**: 369-81.
41. Mauro, MJ et Druker, BJ. *Chronic myelogenous leukemia*, Current Opinion in Oncology, 2001, **13**(1): 3-7.
42. Lee, SJ. *Chronic myelogenous leukaemia*, British Journal of Haematology, 2000, **111**(4): 993-1009.
43. Kalidas, M, Kantarjian, H et Talpaz, M. *Chronic myelogenous leukemia*, Jama, 2001, **286**(8): 895-8.
44. Cilloni, D, Guerrasio, A, Giugliano, E, Scaravaglio, P, Volpe, G, Rege-Cambrin, G et Saglio, G. *From genes to therapy: the case of Philadelphia chromosome-positive leukemias*, Annals of the New York Academy of Sciences, 2002, **963**: 306-12.
45. Deininger, MW, Goldman, JM et Melo, JV. *The molecular biology of chronic myeloid leukemia*, Blood, 2000, **96**(10): 3343-56.
46. Yuan, ZM, Huang, Y, Whang, Y, Sawyers, C, Weichselbaum, R, Kharbanda, S et Kufe, D. *Role for c-Abl tyrosine kinase in growth arrest response to DNA damage*, Nature, 1996, **382**(6588): 272-4.
47. Maru, Y. *Molecular biology of chronic myeloid leukemia*, International Journal of Hematology, 2001, **73**(3): 308-22.
48. Daley, GQ, Van Etten, RA et Baltimore, D. *Induction of chronic myelogenous leukemia in mice by the P210bcr/abl gene of the Philadelphia chromosome*, Science, 1990, **247**(4944): 824-30.
49. Sawyers, CL, McLaughlin, J et Witte, ON. *Genetic requirement for Ras in the transformation of fibroblasts and hematopoietic cells by the Bcr-Abl oncogene*, Journal of Experimental Medicine, 1995, **181**(1): 307-13.
50. Sawyers, CL, Callahan, W et Witte, ON. *Dominant negative MYC blocks transformation by ABL oncogenes*, Cell, 1992, **70**(6): 901-10.
51. Afar, DE, Goga, A, McLaughlin, J, Witte, ON et Sawyers, CL. *Differential complementation of Bcr-Abl point mutants with c-Myc*, Science, 1994, **264**(5157): 424-6.

52. Novartis, Inc. (20 septembre 2002). *Avis favorable du CPMP pour Glivec dans la leucémie myéloïde chronique dès le diagnostic chez l'adulte et l'enfant. Nouvelle étape franchie vers l'approbation européenne du traitement de première intention*, retiré le 3 octobre 2002 de <http://dominoext.novartis.com/NC/NCPRRE01.nsf>
53. Margolis, J, Borrello, I et Flinn, IW. *New approaches to treating malignances with stem cell transplantation*, Seminars in Oncology, 2000, **27**(5): 524-30.
54. Slavin, S. *New strategies for bone marrow transplantation*, Current Opinion in Immunology, 2000, **12**(5): 542-51.
55. Bhatia, R, Verfaillie, CM, Miller, JS et McGlave, PB. *Autologous transplantation therapy for chronic myelogenous leukemia*, Blood, 1997, **89**(8): 2623-34.
56. Faderl, S, Talpaz, M, Estrov, Z et Kantarjian, HM. *Chronic myelogenous leukemia: biology and therapy*, Annals of Internal Medicine, 1999, **131**(3): 207-19.
57. Peters, WP, Hamm, C et Baynes, RD, *Autologous Bone Marrow and Stem Cell Transplantation*, in *Cancer medicine*, R.C. Bast, et al., 2000, B.C. Decker, Hamilton: 890-910.
58. Carlo-Stella, C, Mangoni, L, Almici, C, Caramatti, C, Cottafavi, L, Dotti, GP et Rizzoli, V. *Autologous transplant for chronic myelogenous leukemia using marrow treated ex vivo with mafosfamide*, Bone Marrow Transplantation, 1994, **14**(3): 425-32.
59. Kennedy, MJ, Beveridge, RA, Rowley, SD, Gordon, GB, Abeloff, MD et Davidson, NE. *High-dose chemotherapy with reinfusion of purged autologous bone marrow following dose-intense induction as initial therapy for metastatic breast cancer*, Journal of the National Cancer Institute, 1991, **83**(13): 920-6.
60. Daziano, JP, Humeau, L, Henry, M, Mannoni, P, Chanon, M, Chabannon, C et Julliard, M. *Preferential photoinactivation of leukemia cells by aluminum phthalocyanine*, Journal of Photochemistry & Photobiology. B - Biology, 1998, **43**(2): 128-35.
61. Villeneuve, L. *Ex vivo photodynamic purging in chronic myelogenous leukaemia and other neoplasias with rhodamine derivatives*, Biotechnology & Applied Biochemistry, 1999, **30**(Pt 1): 1-17.
62. Theratechnologies, inc. (7 aout 2002). *Produits en développement clinique*. retiré le 16 octobre 2002 de http://www.theratech.com/francais/produits/axecell/develop_thermalux.html

63. Lydaki, E, Dimitriou, H, Papazoglou, T, Liu, WQ et Kalmanti, M. *Merocyanine 540 mediated photolysis of normal bone marrow, committed hemopoietic progenitors and neoplastic cells. implications for bone marrow purging*, Leukemia Research, 1997, **21**(7): 641-50.
64. Atzpodien, J, Gulati, SC et Clarkson, BD. *Comparison of the cytotoxic effects of merocyanine-540 on leukemic cells and normal human bone marrow*, Cancer Research, 1986, **46**(10): 4892-5.
65. Margolin, KA, Wright, C et Forman, SJ. *Autologous bone marrow purging by in situ IL-2 activation of endogenous killer cells*, Leukemia, 1997, **11**(5): 723-8.
66. Mulrone, CM, Gluck, S et Ho, AD. *The use of photodynamic therapy in bone marrow purging*, Seminars in Oncology, 1994, **21**(6 Suppl 15): 24-7.
67. Gluck, S, Chadderton, A et Ho, AD. *The selective uptake of benzoporphyrin derivative mono-acid ring A results in differential cell kill of multiple myeloma cells in vitro*, Photochemistry & Photobiology, 1996, **63**(6): 846-53.
68. Fiedorowicz, M, Pituch-Noworolska, A et Zembala, M. *The photodynamic effect of Victoria blue BO on peripheral blood mononuclear and leukemic cells*, Photochemistry & Photobiology, 1997, **65**(5): 855-61.
69. Jamieson, CH, McDonald, WN et Levy, JG. *Preferential uptake of benzoporphyrin derivative by leukemic versus normal cells*, Leukemia Research, 1990, **14**(3): 209-19.
70. Valinsky, JE, Easton, TG et Reich, E. *Merocyanine 540 as a fluorescent probe of membranes: selective staining of leukemic and immature hemopoietic cells*, Cell, 1978, **13**(3): 487-99.
71. Modica-Napolitano, JS, Joyal, JL, Ara, G, Oseroff, AR et Aprille, JR. *Mitochondrial toxicity of cationic photosensitizers for photochemotherapy*, Cancer Research, 1990, **50**(24): 7876-81.