HAL
open science

Thérapie photodynamique (PDT) dans un modèle in vitro et in vivo de cancer colorectal : utilisation d'un photosensibilisateur nanovectorisé

Ludovic Bretin

▶ **To cite this version:**

Ludovic Bretin. Thérapie photodynamique (PDT) dans un modèle in vitro et in vivo de cancer colorectal : utilisation d'un photosensibilisateur nanovectorisé. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2019. Français. NNT : 2019LIMO0052 . tel-02443215

HAL Id: tel-02443215

https://theses.hal.science/tel-02443215v1

Submitted on 17 Jan 2020

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.

Thèse de doctorat

Université de Limoges

ED 615 - Sciences Biologiques et Santé (SBS)

Laboratoire PEIRENE EA 7500, Faculté de Pharmacie

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline/Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Présentée et soutenue par

Ludovic BRETIN

Le 18 décembre 2019

Thérapie photodynamique (PDT) dans un modèle *in vitro* et *in vivo* de cancer colorectal : utilisation d'un photosensibilisateur nanovectorisé

Thèse dirigée par :

M. David Yannick LEGER, Maître de Conférences

M. Bertrand LIAGRE, Professeur des Universités

JURY :

Rapporteurs

➢ M. Sylvestre BONNET, Associate Professor, Université de Leyde, Pays-Bas

➢ Mme Magali GARY-BOBO, Chargée de Recherche, Université de Montpellier, France

Examinateurs

➢ M. Vincent CHALEIX, Professeur des Universités, Université de Limoges, France

➢ M. David Yannick LEGER, Maître de Conférences, Université de Limoges, France

➢ M. Bertrand LIAGRE, Professeur des Universités, Université de Limoges, France

➢ M. François MOREAU-GAUDRY, Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Bordeaux, France

À mon grand-père,

01/11/2019

« Si vous prenez soin de vos employés, ils prendront soin de votre entreprise »

- Richard Branson -

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Remerciements

À Mme le Docteur Magali GARY-BOBO
Chargée de Recherche
Université de Montpellier – Institut des Biomolécules Max Mousseron UMR 5247 – France

À M. le Docteur Sylvestre BONNET
Associate Professor
Université de Leyde – Institut de Chimie de Leyde – Pays-Bas

À M. le Professeur François MOREAU-GAUDRY
Professeur des Universités-Praticien Hospitalier
Université de Bordeaux – Biothérapie des Maladies Génétiques Inflammatoires et Cancers U1035 INSERM – France

Je tiens tout particulièrement à vous remercier de me faire l'honneur de votre présence dans ce jury et de juger mes travaux de thèse. Je vous exprime, à tous les trois, ma profonde reconnaissance et tout mon respect.

À M. le Professeur Vincent CHALEIX
Professeur des Universités
Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques – Laboratoire PEIRENE EA 7500 – France

Je tiens à vous remercier d'avoir accepté de faire partie de ce jury tout comme de m'avoir toujours suivi dans mes envies scientifiques. Un grand merci également pour votre remarquable encadrement de Soukaina sans qui la base de ces travaux n'aurait pas pu être réalisée.

À M. le Professeur Bertrand LIAGRE
Professeur des Universités
Université de Limoges, Faculté de Pharmacie – Laboratoire PEIRENE EA 7500 – France

Ah Bertrand... un directeur de thèse pas comme les autres. Tu es quelqu'un d'extrêmement exigeant, un brin insupportable des fois il faut bien le reconnaître mais quel plaisir de travailler avec toi. Tu as toujours été disponible et très réactif pour répondre à toutes mes demandes, tu as toujours fait le maximum pour que je sois dans les meilleures conditions afin de mener à bien ce projet de thèse. Je te remercie énormément de la confiance que tu m'as accordée tout au long de ces trois années et même encore pour les prochains mois, eh bien oui être post-doc sans être doc c'est quand même la classe. Je tiens quand même à te rappeler que nous avons un match de tennis à faire avant mon départ, je peux comprendre qu'une humiliation par son étudiant en thèse n'est pas agréable mais tu n'y échapperas pas aussi facilement =D.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

À M. le Docteur David Yannick LEGER
Maître de Conférences
Université de Limoges, Faculté de Pharmacie – Laboratoire PEIRENE EA 7500 – France

Je tiens à te remercier pour la confiance que tu m'as accordée tout au long de ce projet de thèse mais également pour tous tes petits conseils scientifiques et techniques que tu as pu me donner afin de faire évoluer et progresser mes travaux de recherche.

À M. le Professeur Vincent SOL
Professeur des Universités
Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques – Laboratoire PEIRENE EA 7500 – France

Je tiens à vous remercier de la confiance que vous m'avez accordée pour faire partie de l'équipe de votre laboratoire. Un grand merci à vous de m'avoir donné les moyens de m'épanouir dans mon projet de thèse, notamment en ce qui concerne les déplacements en Allemagne et aux États-Unis. Au plaisir de partager de nouveau des Weissbier et des Spätzle en congrès.

À M. le Professeur Alexis DESMOULIERE
Professeur des Universités
Université de Limoges, Faculté de Pharmacie – Maintenance Myélinique et Neuropathies Périphériques EA 6309 – France

Je tiens à vous remercier de m'avoir donné l'opportunité d'intégrer votre équipe pédagogique pendant ces deux années d'enseignement en physiopathologie, en histologie et en expérimentation animale. Ce fut un réel plaisir de travailler en collaboration avec vous, dans de telles conditions et de découvrir le métier d'enseignant à vos côtés.

À Mme Aline PINON

Aline... quel plaisir de travailler avec son double avec qui je peux avoir une totale confiance. Je te remercie tellement, et bien sincèrement pour tout ce que tu as pu m'apporter durant ces trois années de thèse notamment avec toutes tes connaissances techniques même si bon au fil du temps, l'élève a dépassé le maître =P. Un grand merci pour ta très forte implication dans mon projet de thèse que ce soit pour tes corrections, ta disponibilité ou ton aide en général. Et, même si je suis un ange je te félicite aussi pour ta patience pour me supporter ; tu vas assurément me manquer.

À Mme Frédérique MARTIN

Je te remercie Fred pour ta présence au quotidien, même si le café est meilleur dans mon bureau c'est toujours un plaisir d'échanger avec toi. Merci pour ton aide et tes recommandations judicieuses tout au long de ce projet de thèse.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

À M. le Docteur Guillaume CHEMIN
Maître de Conférences
Université de Limoges, Faculté de Pharmacie – Laboratoire PEIRENE EA 7500 – France

Malgré que nous n'ayons pas encore trop eu l'occasion de travailler ensemble alors que nos bureaux sont quand même l'un à côté de l'autre, je te remercie pour tes précieux conseils tout au long de mon projet de thèse et pour nos nombreuses discussions sur l'irradiation verte qui restent jusqu'à ce jour toujours et encore infructueuses mais persévérons.

À Mme le Docteur Soukaina BOURAMTANE

Je tiens tout particulièrement à te remercier pour ton implication dans notre collaboration dans nos projets de thèse respectifs. Même si j'ai pu des fois râler sur les délais de disponibilité de tes superbes traitements, parce que oui il est bien connu que des problèmes peuvent arriver du côté bio mais jamais en chimie =D, je te remercie grandement de ta disponibilité, de ta gentillesse, de ton écoute même si des fois le passage bio à chimie et inversement n'est pas toujours évident ; je crois que nous nous en sommes quand même bien sortis. Je te souhaite le meilleur pour la suite mais n'oublie pas les synthèses des nouveaux traitements, il y a encore du boulot avant février 2020 et avant que tu te débarrasses de moi =P.

À ceux qui m'ont aidé pour mener à bien ce projet de thèse

Je tiens à tous vous remercier très sincèrement de l'aide que vous avez pu m'apporter tout au long de ces trois années de thèse car malgré de nombreuses sollicitations vous avez toujours été là pour y répondre avec une si grande gentillesse. Un grand merci à **Mme Catherine OUK** pour ta patience tout au long de nos nombreuses heures aux cytomètres, je te l'aurai bien fatigué le pépère AMNIS®. Un immense merci à **Mme Laurence RICHARD** pour ta gentillesse, ta patience et ton dévouement dans nos passionnantes mais interminables journées dans cette magnifique pièce noire où à chaque fois je te disais hummm non pas celle-là, elle est moche. Un énorme merci à **Mme Marie-Laure PERRIN** pour ta gentillesse et ton implication dans mes résultats *in vivo*. Merci de l'opportunité que tu m'as donnée de réaliser mes études de biodistribution, indispensables à mon projet de recherche. Un grand merci à **M. Alain CHAUNAVEL** pour votre implication dans mes travaux en histologie et surtout pour votre très grande réactivité. Un immense merci à **Mme Claire CARRION** pour ta grande gentillesse et disponibilité que ce soit pour la microscopie confocale mais aussi en dehors du côté scientifique. Un grand merci à **Mme Sandrine ROBERT** pour ta disponibilité et ta gentillesse dans mes sollicitations parfois importantes dans l'organisation de mes travaux en histologie. Un énorme merci à **Mme le Docteur Mathilde DUCHESNE** pour l'analyse anatomo-cyto-pathologique des coupes de mes travaux *in vivo* et de m'avoir transmis de nombreuses connaissances scientifiques et médicales dans ce domaine. Merci à **Mme le Docteur Jeanne COOK-MOREAU** pour votre relecture de ma publication qui a assurément permis de valider mon travail auprès de « Cancers ». Je ne sais pas si c'est la meilleure pour la fin, mais je tiens tout particulièrement à remercier **Mme Laetitia VIGNAUD** notamment pour nos grandes heures d'enseignements, nos moments déprimants avec certains étudiants insupportables mais aussi pour les nombreux bons moments que nous avons partagés, merci également de m'avoir permis de réaliser des marquages IHC dans ton laboratoire.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

À tous les stagiaires passés par le laboratoire

Je tiens à tous vous remercier mais plus particulièrement **M. Valentin GONZALEZ**, **Mme Marie-Sophie COUTOULY**, **M. Arthur DAVIAUD** et **Mme Clara LESTANG**. J'espère que mon encadrement durant vos stages respectifs n'a pas été trop compliqué à vivre pour vous et que j'ai pu vous apporter un petit quelque chose à chacun que ce soit scientifiquement ou personnellement qui restera. Un grand merci à tous les stagiaires que j'ai pu également côtoyer et aider durant leur passage au laboratoire, notamment Elodie, Ophélie, Anyce, Dina, Alexia, Claire, Marion, merci à tous pour votre gentillesse et votre bonne humeur.

Aux membres du Laboratoire PEIRENE

Je tiens à tous vous remercier pour votre accueil au sein du laboratoire PEIRENE ainsi que pour vos réponses à toutes mes sollicitations. Je pense notamment à **Mme le Docteur Frédérique BREGIER** pour son implication dans l'encadrement de Soukaina mais surtout pour son aide dans la synthèse des traitements nécessaires à mon projet de thèse, à **Mme Sylvie POIRIER** pour sa disponibilité pour l'organisation de mes déplacements mais aussi à Guillaume, Tan, Claude, Gabin, Benjamin, Aurélie, Zineb, au MacGyver Patrick et à tous ceux que j'oublie certainement... Je tiens également à remercier très chaleureusement **Mme le Docteur Agnès GERMOT** pour son dévouement dans l'encadrement de mon stage de M2 ainsi que **M. le Docteur Sébastien LEGARDINIER** et **M. le Professeur Abderrahman MAFTAH** pour leur gentillesse et leur disponibilité lors de mon passage dans leur laboratoire.

À mes amis

Je tiens à tous vous remercier pour votre présence et votre soutien tout au long de ces années. Je suis sincèrement touché de votre présence le jour de ma soutenance pour ceux qui ont réussi à se libérer en cette date assez compliquée, pour les autres je suis certain que vous penserez à moi, nous aurons largement l'occasion d'en profiter plus tard.

À ma famille

Je tiens à vous remercier énormément pour votre soutien et votre présence dans tout ce que j'entreprends au cours de ma vie. Un grand merci tout particulier à mes parents sans qui je n'en serai pas là où j'en suis actuellement. Même si la vie n'est pas toujours facile surtout ces dernières années, sachez que je serai toujours présent pour vous. Merci également à ma belle-famille de votre gentillesse et de votre accueil, c'est toujours un si grand bonheur de passer des moments ensemble.

À Stessy

Voilà déjà plus de 6 ans que tu partages ma vie. Je te remercie pour ta présence inconditionnelle à mes côtés, pour ton soutien enfin pour tout en général. Je sais que je ne suis pas toujours facile à vivre et que ces trois années de thèse n'ont pas toujours été évidentes que ce soit sur l'éloignement et sur mon indisponibilité physique ou mentale à certains moments. J'espère partager pour encore de nombreuses années ta vie, comme le proverbe dit *« tout seul on va plus vite, ensemble, on va plus loin »*, tout simplement merci d'être là, je t'aime.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Droits d’auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :
« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »
disponible en ligne : *http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/*

Sommaire

Remerciements ... 3
Droits d'auteurs ... 7
Sommaire ... 8
Liste des abréviations ... 11
Introduction bibliographique ... 17
Chapitre I. Le cancer colorectal ... 18
I.1. Le gros intestin ... 18
I.2. Le cancer colorectal ... 24
I.3. Les traitements ... 37
Chapitre II. La thérapie photodynamique ... 49
II.1. Principe de la thérapie photodynamique ... 49
II.2. Les mécanismes de la thérapie photodynamique ... 49
II.3. Les réactions photochimiques ... 52
II.4. Le photo-blanchiment des photosensibilisateurs ... 56
II.5. Les photosensibilisateurs ... 57
II.6. La thérapie photodynamique dans le traitement du cancer colorectal ... 70
Chapitre III. Les nanoparticules ... 73
III.1. Les nanoparticules ... 73
III.2. L'effet EPR ... 75
III.3. Les différents types de nanoparticules ... 77
III.4. Les nanoparticules de première génération ... 84
III.5. Les nanoparticules de deuxième génération ... 85
III.6. Les nanoparticules de troisième génération ... 87
III.7. Les nanoparticules dans les traitements anticancéreux ... 87
III.8. Les nanoparticules et la thérapie photodynamique dans le traitement du cancer colorectal ... 89
Chapitre IV. L'apoptose ... 91
IV.1. Les rôles physiologiques de l'apoptose ... 92
IV.2. Les voies d'induction de l'apoptose ... 93
IV.3. L'apoptose et la thérapie photodynamique anticancéreuse ... 104
Chapitre V. L'autophagie ... 106
V.1. Les différentes formes d'autophagie ... 106
V.2. Les étapes de la macro-autophagie ... 108
V.3. Le rôle paradoxal de l'autophagie dans les cancers ... 112
V.4. L'autophagie et la thérapie photodynamique anticancéreuse ... 113
Projet de recherche ... 115
Matériels et méthodes ... 117
Chapitre I. Expérimentations *in vitro* ... 118
I.1. Matériels ... 118
I.2. Synthèse de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs ... 118
I.3. Lignées et culture cellulaires ... 119
I.4. Traitements et irradiations ... 119
I.5. Étude de la viabilité cellulaire ... 119
I.6. Dosage du taux cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène ... 120
I.7. Étude de l'internalisation et de la localisation cellulaire ... 121

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.8. Analyses en microscopie électronique à transmission 121
I.9. Analyse de l'expression des protéines 122
I.9.1. Extraction des protéines 122
I.9.2. Expression des protéines 122
I.10. Étude de la mort cellulaire 123
I.10.1. Étude du potentiel membranaire mitochondrial 123
I.10.2. Analyse multiparamétrique de l'apoptose grâce à l'annexine V et l'iodure de propidium 124
I.10.3. Analyse quantitative des caspases 3/7 activées 124
I.10.4. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN 125
I.11. Analyses statistiques 125
Chapitre II. Expérimentations *in vivo* 126
II.1. Création d'un modèle de xénogreffe sous-cutanée de cancer colorectal humain 126
II.2. Traitements et irradiations 126
II.3. Étude de l'efficacité anti-tumorale et de la biocompatibilité 127
II.4. Analyse de la biodistribution 127
II.5. Déclaration éthique 128
II.6. Analyses statistiques 128
Partie expérimentale 129
Chapitre I. Expérimentations *in vitro* 130
I.1. Étude de la viabilité cellulaire 130
I.2. Dosage du taux cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène 133
I.3. Étude de l'internalisation cellulaire 136
I.4. Étude de l'internalisation et de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs par MET 143
I.5. Étude de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs 145
I.6. Étude du potentiel membranaire mitochondrial 152
I.7. Étude du niveau d'apoptose 155
I.8. Analyse quantitative des caspases 3/7 activées 158
I.9. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN 162
I.10. Analyse de la morphologie cellulaire par MET 164
I.11. Quantification de l'expression d'acteurs de l'autophagie 167
I.11. Analyse de l'autophagie par MET 171
I.12. Étude du niveau d'apoptose après inhibition de l'autophagie 173
I.13. Analyse quantitative des caspases 3/7 activées après inhibition de l'autophagie 176
I.14. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN après inhibition de l'autophagie 180
Chapitre II. Expérimentations *in vivo* 183
I.1. Étude de la croissance tumorale 183
I.2. Étude de la morphologie et de la structure des tumeurs 186
I.3. Étude du niveau d'apoptose dans les tumeurs 187
I.4. Étude du niveau d'autophagie dans les tumeurs 188
I.5. Étude de la morphologie et de la structure des tumeurs en fin d'étude 189
I.6. Étude de la prolifération des cellules tumorales en fin d'étude 190
I.7. Étude de la biodistribution 191
I.8. Étude de la biocompatibilité 192
Discussion 194
I.1. Intérêt de la vectorisation de la TPPOH par des SNPs 195
I.2. Biocompatibilité et toxicité des SNPs 197

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.3. Mécanismes de mort cellulaire induits par la PDT 198
I.4. Mécanisme de résistance à l'apoptose induite par la PDT 199
Conclusions et perspectives 201
Références bibliographiques 207
Table des illustrations 233
Table des tableaux 238
Table des matières 239
Publications 243

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Liste des abréviations

ΔΨm : potentiel membranaire mitochondrial

3-MA : 3-méthyladénine

5-ALA : acide 5-aminolévulinique

5-FdUMP : 5-fluorodésoxyuracile monophosphate

5-FU : 5-fluorouracil

5-FUTP : 5-fluorouridine triphosphate

A

ABC : accelerated blood clearance

ADN : acide désoxyribonucléique

AEM : agence européenne des médicaments

AIF : apoptosis-inducing factor

Ambra-1 : activating molecule in beclin-1-regulated autophagy protein 1

AMH : hormone anti-mullërienne

AMM : autorisation de mise sur le marché

ANT : adénine nucléotide translocase

Apaf-1 : apoptosis protease-activating factor-1

APTES : 3-aminopropyl triéthoxysilane

ARN : acide ribonucléique

ATCC : American Type Culture Collection

ATP : adénosine triphosphate

B

BH : Bcl-2 homology

BIR : baculovirus IAP repeat

BSA : albumine de sérum bovin

C

CARD : caspase activation and recruitment domain

CCR : cancer colorectal

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Ce6 : chlorine e6

CHIP : chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer

Coloration HES : coloration à l'hématoxyline, à l'éosine et au safran

CRD : cysteine-rich domains

D

DCF : 2',7'-dichlorofluorescéine

DCFDA : 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate

DD : death domain

DED : death effector domain

Deptor : DEP domain-containing mTOR-interacting protein

DHE : dihématoporphyrine éther

DISC : death inducing signaling complex

DMSO : diméthylsulfoxyde

DR5 : récepteur de mort 5

E

Effet EPR : enhanced permeability and retention effect

EGFR : récepteur du facteur de croissance épidermique

ERO : espèces réactives de l'oxygène

ESCRT : endosomal sorting complex required for transport

F

FADD : Fas-associated death domain

FDA : Food and Drug Administration

FIP200 : focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa

FITC : isothiocyanate de fluorescéine

FLIP : Fas-associated death domain-like ICE inhibitory proteins

G

Gènes *ATG* : autophagy related genes

Licence CC BY-NC-ND 3.0

H

HER2 : récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain

HIF-1 : hypoxia-inducible factor-1

Hp : hématoporphyrine

HPPH : 2-devinyl-2-(1-hexyloxyéthyle) pyrophéophorbide

HRP : peroxydase de raifort

Hsc70 : heat shock cognate 70 protein

HvD : hydroxyéthylvinyldeutéroporphyrine

I

IAPs : inhibitor apoptosis proteins

IP : iodure de propidium

IRM : imagerie par résonance magnétique

J

JC-1 : 5,5′,6,6′-tétrachloro-1,1′,3,3′-tétraéthylbenzimidazole carbocyanine iodide

L

LAMP-2A : lysosomal-associated membrane protein 2A

LC3-PE : light chain 3-phosphatidylethanolamine

M

m-THPC : *méso*-tétrahydroxyphénylchlorine

MAC : mitochondrial apoptosis-induced channel

MET : microscopie électronique à transmission

MFI : médiane d'intensité de fluorescence

mLST8 : mTOR associated protein LTS8 homolog

MSNs : nanoparticules de silice mésoporeuse

mTOR : mechanistic tsarget of rapasmycin

mTORC1 : mechanistic target of rapamycin complex 1

MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide

Licence CC BY-NC-ND 3.0

N

NAC : N-acétyl-L-cystéine

O

OMS : Organisation mondiale de la Santé

P

PACA : poly(alkyl cyanoacrylates)

PAF : polypose adénomateuse familiale

PARP : poly(ADP-ribose)-polymérase

PBS : tampon phosphate salin

Pc 4 : phtalocyanine 4

PD : photodiagnostic

PDT : thérapie photodynamique

PE : phosphatidyléthanolamine

PEG : polyéthylène glycol

PGA : poly(acide glycolique)

Phénomène MDR : phénomène de résistance multiple aux anticancéreux

PI3K : phosphoinositide 3-kinase

PI3P : phosphatidylinositol-3-phosphate

PIPAC : chimiothérapie intrapéritonéale pressurisée par aérosols

PLA : poly(acide lactique)

PLGA : poly(acide lactique-co-acide glycolique)

POD : anticorps couplé à la peroxydase

POE : poly(oxyde d'éthylène)

PpIX : protoporphyrine IX

PPS : programme personnalisé de soins

PRAS40 : proline-rich Akt substrate of 40 kDa

PS : photosensibilisateur

PTPC : permeability transition pore complex

PTT : photothermie

PVDF : polyfluorure de vinylidène

Licence CC BY-NC-ND 3.0

R

Rab-SNARE : soluble N-éthylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor

Raptor : regulatory-associated protein of mTOR

RE : réticulum endoplasmique

RING : really interesting new gene

RTE : radiothérapie externe

S

SEM : erreur type de la moyenne

SIMPs : soluble inter membrane mitochondrial proteins

SNPs : nanoparticules de silice

SPION : superparamagnetic iron oxide nanoparticles

T

TBHP : hydroperoxyde de tert-butyle

Tdt : désoxynucléotidine terminale transférase

TNF : tumor necrosis factor

TNFR : tumor necrosis factor receptor

TPP : tétraphénylporphyrine

TPPOH : 5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine

TPPOH-X : TPPOH-xylane

TPPOH-X SNPs : nanoparticules de silice recouvertes de la TPPOH-xylane

TRADD : TNF receptor associated death domain

TRAIL : TNF related apoptosis inducing ligand

TUNEL : terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling

U

ULK : Unc-51-like kinase

V

VDAC : canaux anioniques voltage-dépendants

VEGF : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

Licence CC BY-NC-ND 3.0

VEGFR : récepteur du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire

VPS34 : vacuolar protein sorting 34

VTP : thérapie photodynamique ciblée à visée vasculaire

W

WB : Western blot

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Introduction bibliographique

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Chapitre I. Le cancer colorectal

I.1. Le gros intestin

I.1.1. Localisation, organisation et fonctions du gros intestin

Le côlon est un organe essentiel de l'appareil digestif. Il est situé dans la cavité abdominale, dans le prolongement de l'intestin grêle et mesure environ 1,5 m. Associé au rectum, ils forment le gros intestin **(Figure 1)**, c'est-à-dire la dernière partie du tube digestif (1).

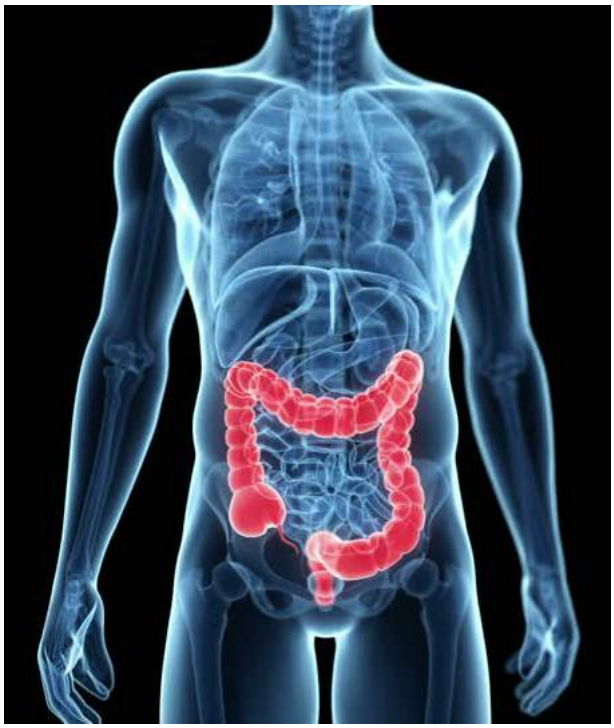


Figure 1 : localisation du gros intestin chez l'être humain

Source : être humain / gros intestin / côlon - Framepool footage

Le côlon est constitué de 4 parties différentes **(Figure 2)** :

- Le côlon ascendant compose la première partie du côlon. Il est aussi appelé côlon droit puisqu'il est situé côté droit du corps humain. Ce segment débute au niveau du cæcum qui relie la dernière partie de l'intestin grêle, l'iléon, au côlon par la valvule iléo-cæcale ou valvule de Bauhin. Le cæcum se situe au niveau de la fosse iliaque droite et possède une petite excroissance, l'appendice vermiculaire. Le côlon ascendant remonte jusqu'à l'hypocondre droit faisant un angle appelé l'angle colique droit. La vascularisation du côlon ascendant est assurée par l'artère mésentérique supérieure. Le réseau lymphatique est garanti par des relais ganglionnaires situés le long du côlon qui se regroupent essentiellement au niveau du nœud rétro-pancréatique.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

- Le côlon transverse s'étend horizontalement au niveau de la troisième vertèbre lombaire, de l'angle colique droit jusqu'à l'angle colique gauche.
- Le côlon descendant ou côlon gauche, se prolonge verticalement, de l'angle colique gauche au niveau de l'hypocondre gauche, côté gauche du corps humain. La vascularisation du côlon descendant est assurée par l'artère mésentérique inférieure. Le réseau lymphatique est similaire à celui de droite, il est garanti par des relais ganglionnaires situés le long du côlon qui se regroupent essentiellement au niveau du nœud rétro-pancréatique.
- La dernière partie du côlon est constituée par le côlon sigmoïde. Il forme une boucle en forme de S au niveau de la fosse iliaque gauche reliant le côlon au rectum.

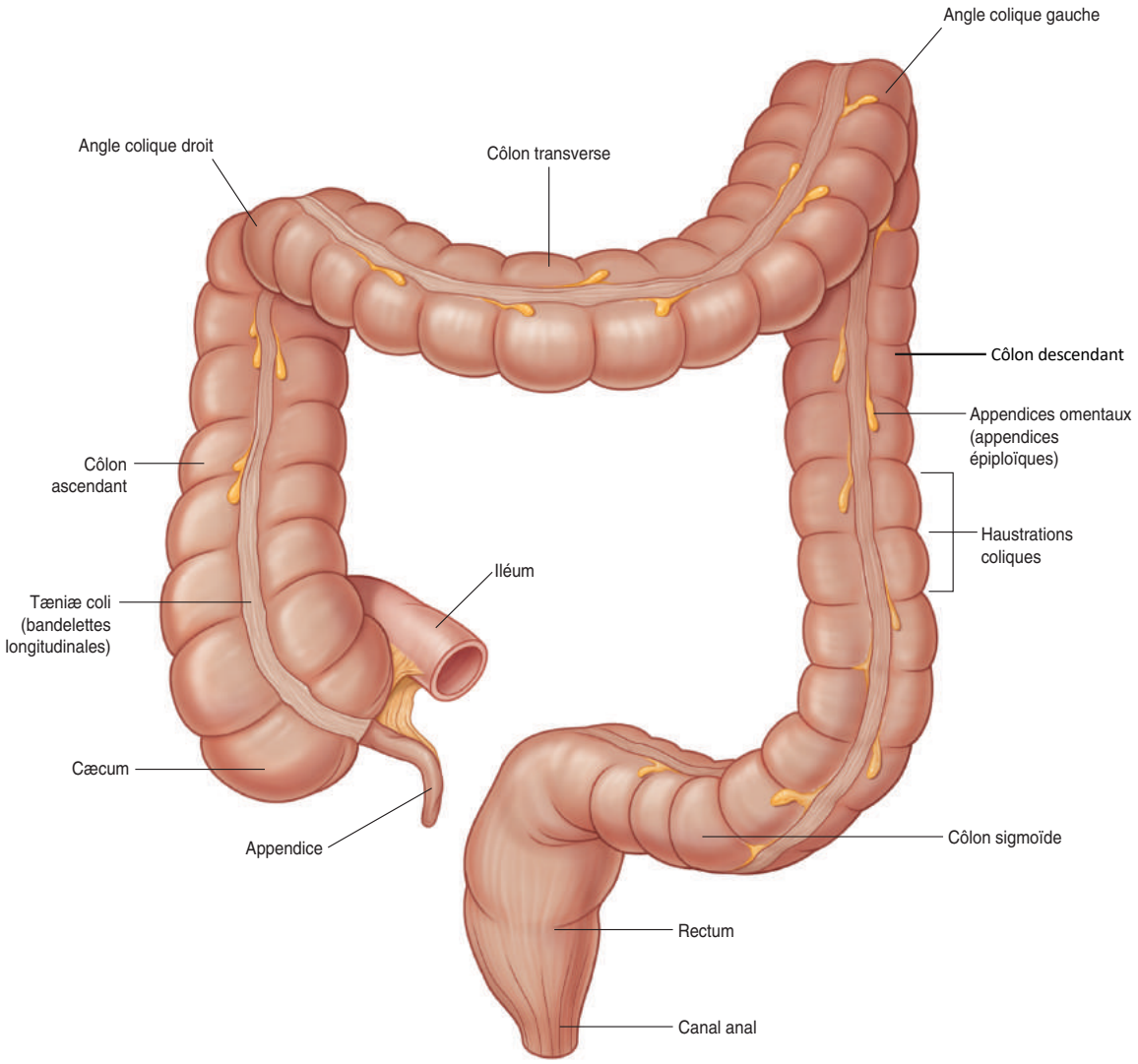


Figure 2 : organisation du gros intestin

Source : adapté de Gray's Anatomie pour les étudiants, Richard L. Drake (traduit de Drake, Vogl, Mitchell, Gray's Anatomy for Students, 2nd ed, 978044306952). Elsevier Masson, 2ème édition, 2011. Figure 4.74

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Le côlon remplit plusieurs fonctions au sein du système digestif. Son rôle principal est d'éliminer les déchets suite à la digestion des aliments dans l'estomac et l'intestin grêle. Le côlon absorbe l'eau du chyle liquide provenant de l'intestin grêle jusqu'à obtenir des matières fécales ou selles. Lors de la progression dans le côlon, les selles deviennent de plus en plus solides par déshydratation. Au niveau du côlon ascendant, elles sont liquides alors qu'au niveau du côlon descendant, elles sont semi-solides. Les matières fécales seront ensuite transmises au rectum afin d'être évacuées par l'anus. L'avancée des matières fécales est permise grâce à la motricité accrue par contraction du côlon. Malgré la pauvreté du chyle en éléments nutritifs à l'entrée du côlon, environ 10%, le côlon a également pour rôle d'absorber le reste des nutriments ainsi que certaines vitamines. La vitamine K, impliquée dans la coagulation, est notamment synthétisée par l'importante flore bactérienne présente au niveau du côlon. Par ailleurs, le côlon exerce un rôle protecteur envers le système digestif en amont. En effet, un sphincter au niveau du cæcum permet d'empêcher le retour de matière vers l'iléon et donc d'éviter la contamination de l'intestin grêle par la flore bactérienne du côlon. De plus, il peut exercer un rôle protecteur envers sa propre muqueuse grâce à la sécrétion de mucus limitant les agressions de la paroi colique.

Le rôle du rectum, petite partie terminale de l'appareil digestif d'environ 15 cm, est de stocker dans l'ampoule rectale les matières fécales avant la déjection au niveau de l'orifice anal. Il est également impliqué dans la défécation où les muscles de l'ampoule anale vont se contracter et les sphincters se détendre permettant la sortie des matières fécales.

I.1.2. Histologie du gros intestin

Histologiquement la paroi du côlon est constituée de 4 couches de tissus, de l'intérieur vers l'extérieur **(Figure 3)** :

- La muqueuse : contrairement à la muqueuse de l'intestin grêle, elle n'est pas pourvue de valvules conniventes et de villosités mais de nombreuses glandes ou cryptes de Lieberkühn. L'épithélium colique est composé majoritairement de cellules caliciformes. La sécrétion de mucus est très importante afin de faciliter la lubrification des matières fécales devenant de plus en plus solide au cours du transit. Les entérocytes ou cellules absorbantes sont également présentes, permettant l'absorption de l'eau et des vitamines synthétisées par la flore bactérienne du côlon. Le chorion comporte de nombreux tissus lymphoïdes mais contrairement à l'iléon, il ne comporte pas de plaque de Peyer.
- La sous-muqueuse : c'est la couche intermédiaire constituée d'un tissu conjonctif lâche présentant de nombreux adipocytes. La sous-muqueuse renferme d'abondants vaisseaux et plexus nerveux appartenant au système nerveux entérique comme notamment le plexus sous-muqueux de Meissner.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

- La musculeuse : c'est la couche externe constituée de 2 couches de fibres musculaires, circulaire interne et longitudinale externe. Cette couche longitudinale se retrouve sous forme de 3 bandelettes longitudinales nommées tænia coli. La couche circulaire interne comporte elle, une succession de petites chambres séparées par des épaississements, les haustrations coliques. L'innervation végétative est également présente entre ces 2 couches, notamment par le plexus myentérique d'Auerbach.
- La sous-séreuse et séreuse : c'est la couche la plus externe, elle est composée d'un tissu adipeux vascularisé. La sous-séreuse est tapissée par la séreuse ou péritoine. C'est une enveloppe qui tapisse toute la paroi externe du gros intestin ayant notamment pour rôles le maintien des organes et le glissement de ces derniers entre eux lors des mouvements de l'individu. La surface du côlon est parsemée de petits amas graisseux, les appendices omentaux, sans rôle connu à ce jour.

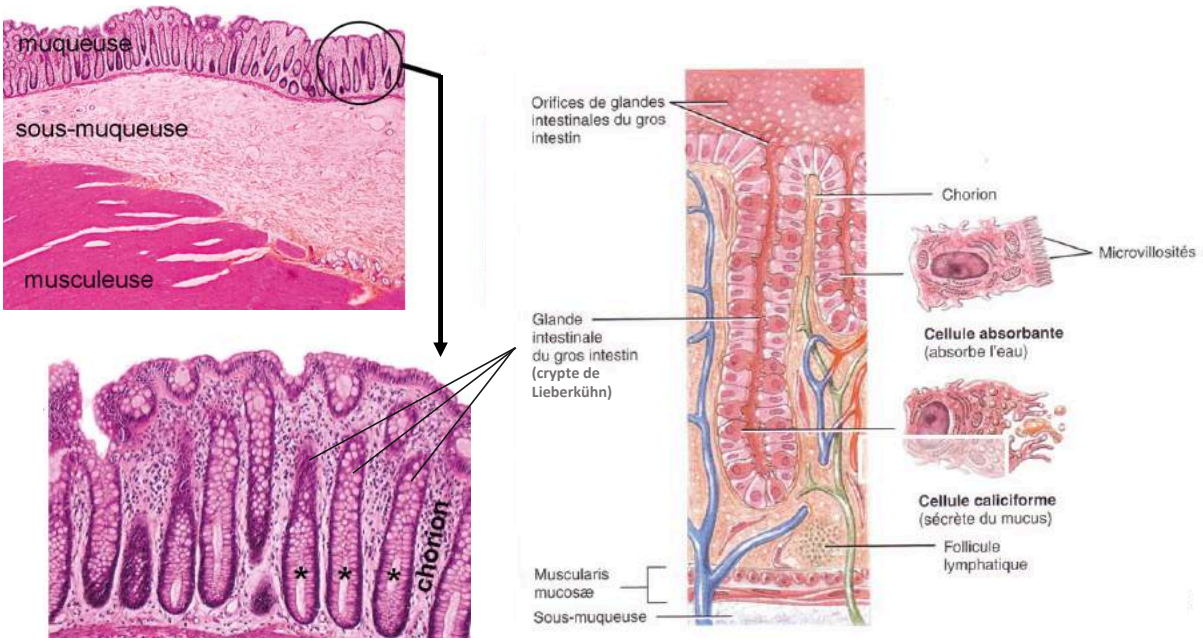


Figure 3 : histologie du côlon

Source : adapté d'anatomie et cytologie pathologiques : rôle clé dans le diagnostic, l'évaluation pronostique et le traitement, Elsevier Health Sciences, Pr. Dominique Wendum

La paroi du rectum est histologiquement très similaire à celle du côlon, le nombre de cellules caliciformes est légèrement plus important afin de permettre la bonne lubrification des selles solides. Néanmoins, le rectum est dépourvu de péritoine, seul le tissu adipeux périrectal est au-delà de la musculeuse nommé mésorectum. La différence majeure réside dans la transition ano-rectale **(Figure 4)**. En effet, la partie supérieure du canal anal comporte un épithélium similaire au rectum avec de nombreuses cryptes de Lieberkühn puis la partie moyenne est tapissée par un épithélium d'aspect varié dit transitionnel. Enfin, la partie inférieure est tapissée d'un épithélium malpighien pluristratifié non kératinisé.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

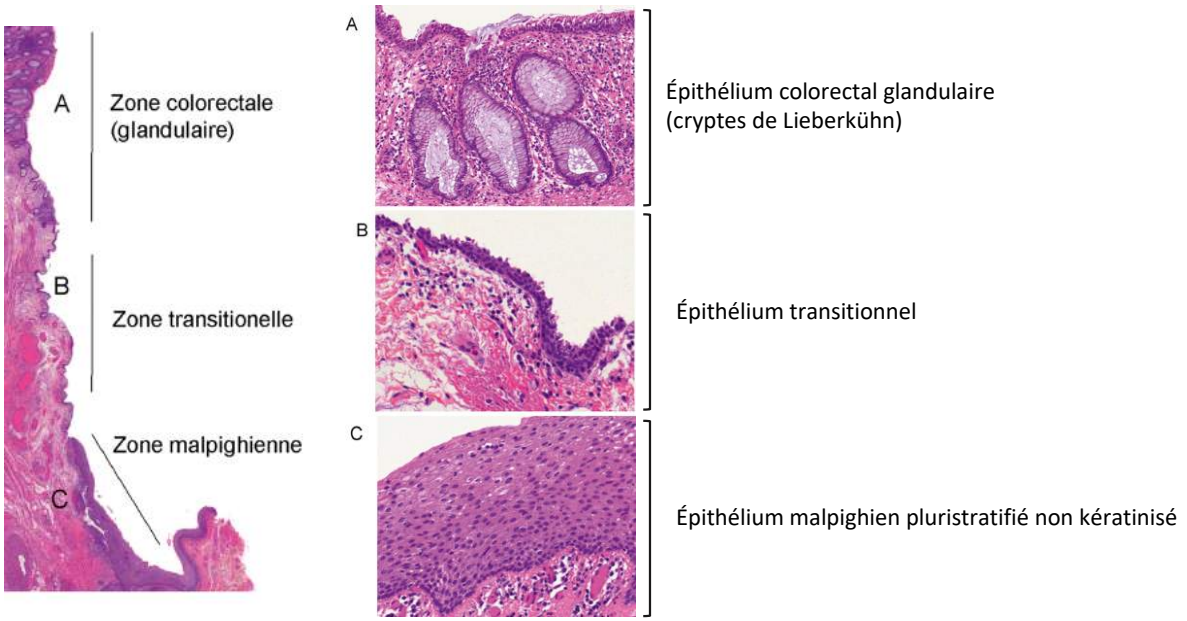


Figure 4 : histologie du canal anal

Source : adapté d'anatomie et cytologie pathologiques : rôle clé dans le diagnostic, l'évaluation pronostique et le traitement, Elsevier Health Sciences, Pr. Dominique Wendum

I.1.3. Pathologies du gros intestin

Le gros intestin est susceptible d'être sujet à plusieurs pathologies comme notamment : la colopathie fonctionnelle, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin, l'occlusion intestinale ou encore le cancer colorectal (CCR).

La colopathie fonctionnelle

La colopathie fonctionnelle ou syndrome du côlon irritable est une anomalie de fonctionnement du côlon. C'est une pathologie assez fréquente, entre 10% et 15% de la population française avec une prédominance chez la femme. Elle est sans gravité directe mais influe sur la qualité de vie des patients. Les symptômes de cette pathologie souvent chronique peuvent être multiples comme des diarrhées ou de la constipation associées à des douleurs abdominales, notamment à cause de crampes intestinales. Il existe 3 sous-types de colopathie fonctionnelle. Premièrement une forme à dominance diarrhéique causée par des phases de contraction/relâchement plus fortes ou plus rapides des muscles intestinaux. Le côlon ne peut donc plus remplir son rôle d'absorption de l'eau du chyle, ce qui provoque des diarrhées. La seconde forme est à constipation prédominante. Cette fois-ci les phases de contraction/relâchement sont plus faibles ou plus lentes entraînant une absorption accrue des fluides. Cette déshydratation trop importante conduit à des matières fécales trop dures et trop sèches donc à de la constipation. Enfin, la troisième forme est une forme mixte alternant des phases de diarrhées et des phases de constipation. Les causes précises de la colopathie fonctionnelle ne sont pas encore connues. Cependant, des pistes s'orientent notamment sur un déséquilibre du microbiote intestinal et/ou des facteurs génétiques.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Actuellement, les traitements sont uniquement symptomatiques. Selon les formes de colopathie fonctionnelle, des laxatifs ou émollients pourront être prescrits pour la constipation, des suppléments de fibres ou des antidiarrhéiques pour les diarrhées ou encore des antispasmodiques en cas de douleur.

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont causées par une hyperactivité du système immunitaire au niveau digestif conduisant à l'inflammation des parois intestinales. Il en existe 2 sous-catégories, la maladie de Crohn qui peut être localisée dans l'ensemble du système digestif et la rectocolite hémorragique au niveau du côlon et du rectum. En France, l'incidence de ces pathologies est faible avec moins de 0,5%. La maladie de Crohn est la plus fréquente avec environ 60% des cas. Elle est prédominante chez la femme alors que la rectocolite hémorragique est plus fréquente chez l'homme. La maladie survient sous forme de poussées ou crises inflammatoires de fréquence et de durée variables selon les patients entrecoupées par des phases de rémission. Les symptômes typiques de ces pathologies sont des douleurs abdominales accompagnées de diarrhées parfois sanglantes. Lors de crise, une hospitalisation peut devenir nécessaire tellement les symptômes sont intenses. Les causes de ces pathologies sont multiples. Elles impliquent des facteurs génétiques avec de nombreux gènes de prédisposition, dont notamment le gène *NOD2/CARD15*. Des mutations de ce gène augmenteraient considérablement le risque de développer la maladie de Crohn puisque la protéine traduite est à l'origine de l'activation et de l'emballement de la réponse inflammatoire. Des facteurs environnementaux sont également mis en cause comme l'alimentation, le stress ou encore le tabagisme qui est un facteur de risque pour la maladie de Crohn alors que c'est un facteur de protection pour la rectocolite hémorragique. Après une dizaine d'années d'évolution, les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin sont associées à une augmentation du risque de développer un CCR. Actuellement il n'existe aucun traitement curatif pour ces pathologies. Les traitements s'organisent sous 2 formes et ont pour objectif de réduire l'inflammation. Le traitement d'attaque des poussées est basé sur l'utilisation d'aminosalicylés pour les poussées légères et des corticoïdes pour les poussées plus sévères. Parallèlement, un traitement d'entretien à base d'immunosuppresseurs est prescrit aux patients afin de prévenir les rechutes.

L'occlusion intestinale

L'occlusion intestinale correspond à un blocage partiel ou complet du transit intestinal empêchant le passage des matières fécales et des gaz. Cette pathologie est assez fréquente puisqu'elle est dépendante de nombreuses causes. C'est une pathologie très grave si elle n'est pas prise en charge rapidement. L'occlusion intestinale peut engendrer de sérieuses complications comme la nécrose ou la perforation de la paroi intestinale pouvant provoquer une péritonite et dans certains cas le décès du patient. L'occlusion intestinale peut être de 2 origines, fonctionnelle ou mécanique. L'occlusion intestinale fonctionnelle est provoquée par une anomalie du fonctionnement des intestins.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Cette pathologie correspond à une hypomotricité intestinale ou iléus paralytique, les fibres musculaires ne se contractant plus, l'évacuation du contenu intestinal devient donc impossible. Cette origine est souvent résultante d'une opération intestinale. L'occlusion intestinale mécanique quant à elle peut être due à un volvulus, c'est à dire une torsion du tube intestinal sur lui-même ou d'une obstruction par un obstacle. Au niveau du côlon, l'obstruction mécanique est fréquemment due à une tumeur obstruant la lumière intestinale. Les traitements peuvent aller, selon la gravité des symptômes du patient, de la pose d'une sonde naso-gastrique afin de diminuer la pression intestinale à la chirurgie afin d'éliminer la torsion ou l'exérèse de l'obstacle et notamment les tumeurs colorectales.

Le cancer colorectal

Le CCR, comme n'importe quel autre cancer, est caractérisé par la prolifération incontrôlée de certaines cellules. Suite à une ou plusieurs mutations, ces cellules vont pouvoir échapper aux mécanismes de contrôle et se multiplier de façon complétement anarchique. Cette prolifération incontrôlée va donner naissance à une tumeur dans un premier temps bénigne peu dangereuse. Les CCR proviennent principalement d'une tumeur bénigne ou polype adénomateux qui évolue en une tumeur maligne dangereuse. Le passage d'une tumeur bénigne à maligne est caractérisé par la capacité des cellules à s'infiltrer dans les différentes couches histologiques de l'organe, on parle alors de tumeur cancéreuse. L'étape la plus dangereuse est l'étape métastatique, lorsque les cellules cancéreuses ont acquis la capacité de se détacher de la tumeur initiale et d'envahir d'autres organes, par le sang ou la lymphe, afin de créer une tumeur secondaire. Dans le CCR, ce sont les métastases au niveau des ganglions lymphatiques voisins ou les métastases hépatiques et pulmonaires qui sont le plus souvent rencontrées. En France, le cancer est un vrai problème de santé publique avec une augmentation du nombre de cancers en constante progression. Depuis quelques années, le cancer est même devenu la première cause de décès en France. L'organisation mondiale de la santé (OMS) estime pour les prochaines années qu'1 personne sur 2 développera un cancer au cours de sa vie, 1 sur 15 pour le CCR. Ces chiffres poussent la recherche médicale vers le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques tant en matière d'efficacité des traitements que de qualité de vie des patients.

I.2. Le cancer colorectal

I.2.1. L'épidémiologie du cancer colorectal

D'après les chiffres du centre international de recherche sur le cancer (CIRC), le CCR est le 3ème cancer le plus diagnostiqué dans le monde tous sexes confondus en 2018 avec une incidence de plus de 1,85 millions de cas derrière le cancer du poumon (≈ 2,09 millions de cas) et le cancer du sein (≈ 2,08 millions de cas). C'est cependant le 2ème cancer le plus mortel avec plus de 880 000 décès derrière le cancer du poumon (≈ 1,76 millions de décès) (2). En France, ce n'est que le 4ème cancer en termes d'incidence tous sexes confondus avec plus de 47 000 cas derrière le cancer de la prostate, du sein et du poumon mais, comme au niveau mondial, le 2ème plus mortel avec presque 20 000 décès en 2018 derrière le cancer du poumon.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Chez l'homme le CCR se situe au 3ème rang en termes d'incidence et au 2ème rang au niveau de la mortalité alors qu'il se situe, chez la femme, au 2ème rang pour l'incidence et au 3ème rang en matière de mortalité. Le risque de développer un CCR, comme pour la plupart des cancers, augmente avec l'âge. Le CCR survient quasiment exclusivement chez les personnes âgées de 50 ans et plus puisque, dans seulement moins de 5% des cas, les CCR se manifestent avant 50 ans **(Figure 5)**. Le risque de développer un CCR augmente entre 50 et 70 ans avec environ 37% des cas et s'accroît nettement après 70 ans avec plus de 58% des cas. Le CCR étant un cancer à long développement, c'est donc pour cette raison que tous les hommes et les femmes âgés de plus de 50 ans sont invités à réaliser un dépistage chaque année par un test de recherche de sang dans les selles. Grâce au programme national de dépistage organisé du CCR, les tumeurs sont prises en charge plus précocement améliorant la survie des patients.

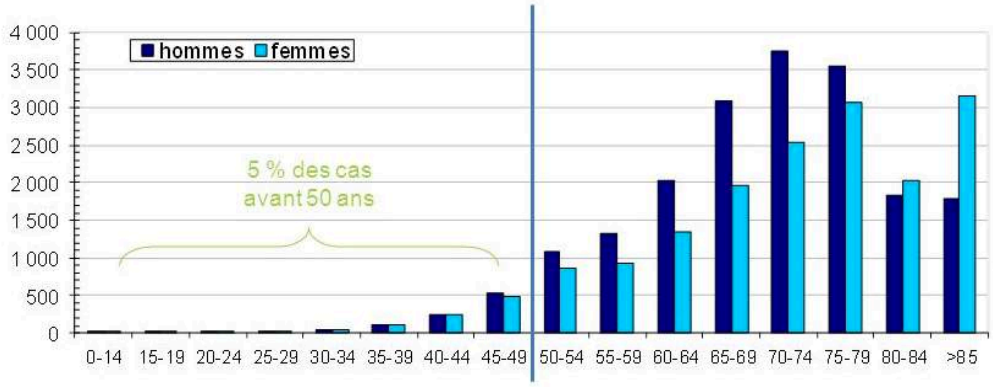


Figure 5 : incidence des cancers colorectaux en fonction de l'âge (2012)

Source : Institut National du Cancer

I.2.2. Les facteurs de risque

Les causes du CCR ne sont pas encore parfaitement définies. Comme la majorité des cancers, le CCR semble être le résultat d'un ensemble de facteurs favorisant plus ou moins son développement. Des facteurs comme l'hérédité, l'environnement, le mode de vie et l'exposition à des substances cancérigènes semblent accroître le risque de développer un CCR. Il existe 3 niveaux de risque de développer un CCR définissant des recommandations de suivi afin de l'éviter.

I.2.2.1. Les personnes à risque moyen de cancer colorectal

Toute personne de plus de 50 ans est considérée comme une personne à risque moyen de développer un CCR. Les CCR avant 50 ans sont très rares mais comme pour la majorité des cancers, le risque de développer un CCR augmente avec l'âge. Le suivi adapté est très simple puisqu'il est basé sur un test immunologique de recherche de sang dans les selles tous les 2 ans pour les personnes âgées de 50 à 74 ans dans le cadre du programme national de dépistage organisé du CCR.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Malgré un risque moyen pour ces personnes, certaines semblent avoir un risque accru de développer un CCR. En effet, plusieurs études scientifiques ont démontré l'impact de certaines habitudes de vie sur le risque de développer un CCR. Une alimentation trop riche couplée à l'inactivité physique entrainant un surpoids augmenterait de façon significative le risque de développer un CCR. L'exposition à des substances cancérigènes de façon abusive et prolongée comme la consommation de tabac par exemple, augmenterait de 2 à 3 fois l'apparition de gros adénomes très fréquemment à l'origine de CCR. A l'inverse, il a été démontré qu'une alimentation saine et variée associée à au moins 30 minutes d'activité physique par jour aurait un effet protecteur du CCR.

I.2.2.2. Les personnes à risque élevé de cancer colorectal

Le groupe à risque élevé concerne les personnes ayant des antécédents personnels et/ou familiaux plus ou moins proches avec le CCR. Les personnes déjà dépistées pour un adénome de plus d'un centimètre, même s'il a été retiré en prévention, ont un risque accru de développer un CCR. Le risque est également significativement augmenté pour les personnes qui ont déjà eu un CCR. Il a effectivement été démontré que le risque qu'un nouveau cancer se développe au niveau d'un site différent du premier ou en récidive locale est décuplé. C'est également le cas pour les personnes atteintes d'un cancer à devenir métastatique comme le cancer de l'endomètre, des ovaires ou de la prostate du fait de la proximité directe avec le gros intestin. Les personnes atteintes de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin comme la maladie de Crohn ou la rectocolite hémorragique évoluant depuis plus de 10 ans ont un risque élevé de développer un CCR. Le risque est plus ou moins important selon plusieurs paramètres comme la durée d'évolution ou l'étendue et la gravité de la maladie. C'est également le cas selon la maladie puisque la maladie de Crohn induit un risque moins élevé de développer un CCR mais elle a tendance à induire des CCR plus précoces chez des personnes de moins de 55 ans. Les antécédents familiaux jouent également un rôle important dans l'augmentation du risque de développer un CCR puisque 10 à 15% des CCR se développent chez des personnes ayant ces antécédents. Le risque de développer un CCR est au moins 2 fois plus élevé lorsqu'un parent du premier degré a été atteint d'un CCR ou d'un adénome de plus d'un centimètre avant 65 ans ou lorsque, quel que soit l'âge, les 2 parents ont été atteints. L'augmentation du risque semble être associée à un risque génétique mais pour l'instant il n'est pas encore clairement identifié. Les personnes à risque élevé du CCR ont pour suivi, à partir de 45 ans, une surveillance régulière par coloscopie afin de réagir au plus vite en cas de survenue d'un CCR.

I.2.2.3. Les personnes à risque très élevé de cancer colorectal

Les personnes atteintes de la polypose adénomateuse familiale (PAF) ou du syndrome de Lynch sont des personnes à risque très élevé de développer un CCR.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

La polypose adénomateuse familiale

La PAF est une maladie héréditaire autosomique dominante. Elle est causée par une mutation génétique impliquant 2 gènes, le gène *APC* et le gène *MYH*. La PAF est caractérisée par le développement jusqu'à plusieurs milliers de polypes dès l'adolescence dans le gros intestin. De façon identique aux patients non atteints de PAF, les polypes ne sont pas plus susceptibles d'évoluer en CCR mais le nombre élevé de polypes décuple le risque. Si aucun traitement préventif n'est mis en place chez ces patients, c'est à dire une colectomie, le risque de développer un CCR est quasiment de 100% avant l'âge de 40 ans. La PAF reste cependant une pathologie rare puisqu'elle ne représente que 1% des CCR. Le diagnostic de la PAF est suspecté par la mise en évidence de plus de 100 polypes à la coloscopie. Afin de confirmer le diagnostic de la PAF, des tests génétiques sont réalisés chez le patient et ses parents du premier degré. Un suivi très régulier par coloscopie est ensuite mis en place.

Le syndrome de Lynch

Le syndrome de Lynch est également une pathologie héréditaire impliquant plusieurs anomalies génétiques. Ces dernières perturbent la réparation des erreurs lors de duplication de l'acide désoxyribonucléique (ADN) pendant la division cellulaire. Le syndrome de Lynch comme la PAF est caractérisé par la présence de nombreux polypes mais en nombre bien inférieur et souvent situés au niveau du côlon ascendant. Le syndrome de Lynch est diagnostiqué dans la plupart des cas après le diagnostic d'un CCR chez une personne de moins de 50 ans ou dans son entourage proche. Cette pathologie est plutôt rare puisqu'elle ne représente que 3% des CCR mais elle augmente de façon importante le risque de développer un CCR. C'est également le cas pour d'autres cancers à proximité du gros intestin comme notamment l'endomètre chez les femmes. Le suivi consiste en une surveillance par coloscopie complète tous les 2 ans dès l'âge de 20 ans et une surveillance de l'endomètre dès l'âge de 30 ans pour les femmes souffrant du syndrome de Lynch. Une consultation d'oncogénétique sera mise en place lors d'une suspicion afin de confirmer la pathologie.

I.2.3. L'anatomopathologie

I.2.3.1. Les différentes formes de cancers colorectaux

Les CCR se développent majoritairement à partir de tumeurs bénignes ou polypes adénomateux. Les polypes sont des excroissances qui se développent à la surface de la muqueuse colorectale. Environ 70% des polypes sont susceptibles d'évoluer en CCR. Ils se développent à partir des glandes de Lieberkühn de la muqueuse colorectale, on parle alors de polypes adénomateux ou adénomes. Heureusement tous les adénomes n'évoluent pas en CCR. Dans la grande majorité des cas, ils vont rester petits et sans évolution. Cependant, certains adénomes (3‰) vont grossir et devenir des CCR. Il existe différents types d'adénomes avec des caractéristiques très différentes :

Licence CC BY-NC-ND 3.0

- L'adénome tubuleux : c'est le plus commun des adénomes, environ 75% des adénomes. C'est le plus petit, moins d'un centimètre et il est moins susceptible d'évoluer en CCR. Il se présente sous la forme d'un champignon lui permettant d'être facilement retiré par polypectomie à l'anse endoscopique.
- L'adénome villeux : il est retrouvé seulement dans 5% des cas. C'est un adénome qui présente un aspect velu, assez gros et difficile à enlever puisqu'il se présente sous forme plate avec une base large. Du fait qu'il a plus de risque à évoluer en CCR et de la complexité à l'enlever, il est souvent nécessaire de pratiquer une colectomie.
- L'adénome tubulovilleux : c'est un adénome à mi-chemin entre les 2 précédents adénomes tant en termes de taille que de capacité à développer un CCR. Il est retrouvé dans environ 20% des cas.
- L'adénome plan : contrairement aux autres adénomes, l'adénome plan ne se développe pas en relief sous forme d'excroissance mais à plat. Il représente le risque le plus important des adénomes à évoluer en CCR.

Les adénomes peuvent rester sous silence de nombreuses années sans donner le signe de leur présence renforçant l'intérêt de dépistages réguliers et de coloscopies. Cependant, si ces adénomes ne sont pas pris en charge assez rapidement, ils peuvent évoluer en CCR. La grande majorité des CCR, plus de 90% des cas, sont des adénocarcinomes. Il existe différents types d'adénocarcinomes mais plus de 95% sont des adénocarcinomes Lieberkühniens, c'est à dire qu'ils se sont développés à partir des glandes de Lieberkühn. Cependant, il existe dans environ 5% des cas, des formes de CCR plus rares :

- Les tumeurs carcinoïdes : elles se développent à partir des cellules nerveuses digestives qui sécrètent des hormones ou des neurotransmetteurs et représentent 1,5% des CCR.
- Les sarcomes : ce sont des tumeurs qui se développent à partir des os ou des tissus mous comme les muscles, les tendons, la graisse.
- Les lymphomes : ces tumeurs se développent dans les organes lymphoïdes dont notamment les ganglions lymphatiques.
- Les mélanomes : ils se développent à partir des mélanocytes présents dans la muqueuse colorectale.

La forme la plus grave des cancers se retrouve lors de la présence de métastases développant une tumeur secondaire. Le gros intestin est parfois envahi par des métastases issues d'organes voisins comme les ovaires ou la prostate, l'estomac ou encore le sein. Ces différentes formes histologiques de cancers permettent aux médecins de définir l'origine du CCR et d'adapter leur diagnostic mais, afin de mettre en place un protocole de traitement adapté il est important de définir l'étendue du cancer.

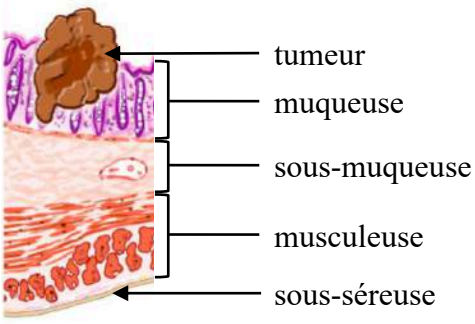
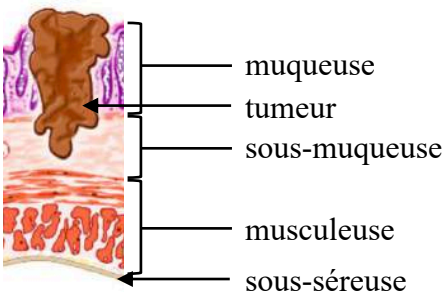
Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.2.3.2. La classification TNM

Lors du diagnostic d'un CCR, il est très important d'identifier le stade du cancer afin d'orienter le protocole de traitement. La classification TNM permet d'évaluer ce stade grâce à une combinaison de 3 critères de propagation anatomique locale, régionale et métastatique (3).

La lettre T est l'indicateur de la taille et de la profondeur de la tumeur (Tableau 1)

Lorsque les cellules deviennent cancéreuses, elles sont localisées à la surface interne de la paroi colorectale mais dans certains cas elles peuvent atteindre des couches plus profondes. L'étude de la taille de la tumeur mais surtout de son étendue histologique permet d'estimer le degré d'évolution de la maladie. Plus la tumeur se sera étendue au niveau des couches histologiques, plus le pronostic de survie sera sévère.

Tx	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive	
T0	Pas de signe de tumeur primitive	
Tis	Carcinome *in situ* : intra-épithélial ou envahissant la lamina propria (chorion de la muqueuse)	
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse	

Licence CC BY-NC-ND 3.0

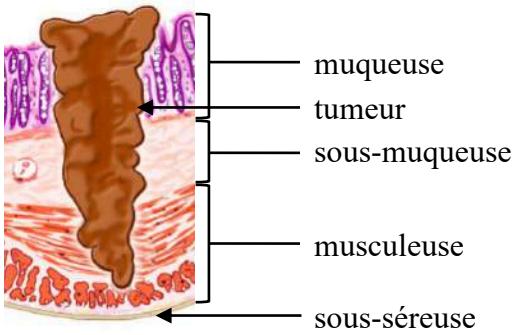
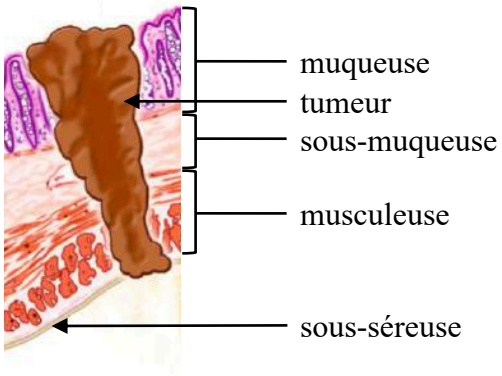
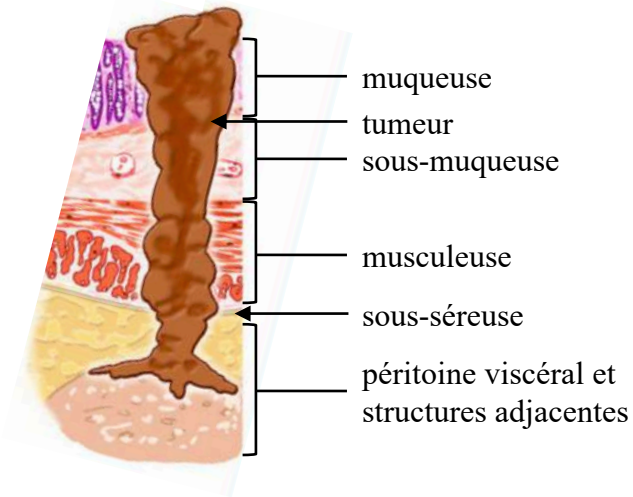
T2	Tumeur envahissant la musculeuse	
T3	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péri-coliques ou péri-rectaux non péritonisés	
T4	**T4a** : tumeur perforant le péritoine viscéral	
	T4b : tumeur envahissant directement d'autres organes ou d'autres structures adjacentes	

Tableau 1 : classification TNM – La lettre T

Source : adapté de Colorectal cancer staging, IMAIOS, Dr. Antoine Micheau

La lettre N est l'indicateur de l'atteinte ganglionnaire et du nombre des ganglions lymphatiques touchés (Tableau 2)

Certaines cellules cancéreuses peuvent se disséminer ailleurs que dans le gros intestin, et notamment au niveau des ganglions lymphatiques environnants, au niveau de la graisse péricolique. L'atteinte des ganglions lymphatiques par les cellules cancéreuses est un signe de mauvais pronostic mais le nombre de ganglions atteints détermine les chances de guérison.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

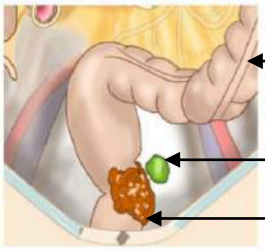
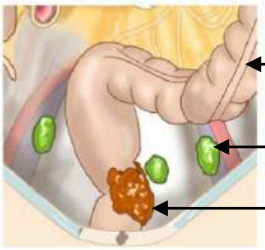
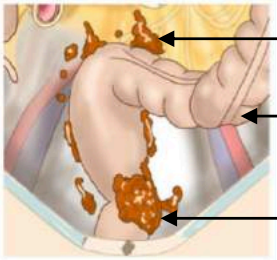
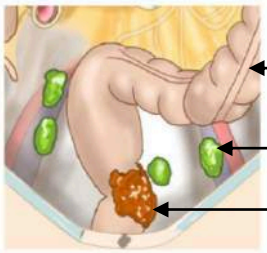
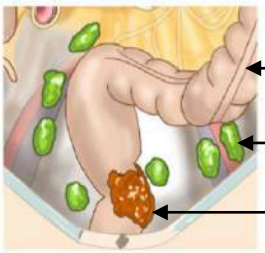
Nx	Renseignements insuffisants pour classer les ganglions lymphatiques régionaux	
N0	Pas de métastase ganglionnaire régionale	
N1	**N1a** : métastases dans 1 seul ganglion régional	 gros intestin ganglion lymphatique régional tumeur
	N1b : métastases dans 2-3 ganglions lymphatiques régionaux	 gros intestin ganglion lymphatique régional tumeur
	N1c : nodules tumoraux (c'est-à-dire satellites) dans la sous-séreuse ou dans les tissus mous non péritonisés péri-coliques ou péri-rectaux sans atteinte ganglionnaire lymphatique	 nodules tumoraux régionaux gros intestin tumeur
N2	**N2a** : métastases dans 4 à 6 ganglions lymphatiques régionaux	 gros intestin ganglion lymphatique régional tumeur
	N2b : métastases dans 7 ou plus ganglions lymphatiques régionaux	 gros intestin ganglion lymphatique régional tumeur

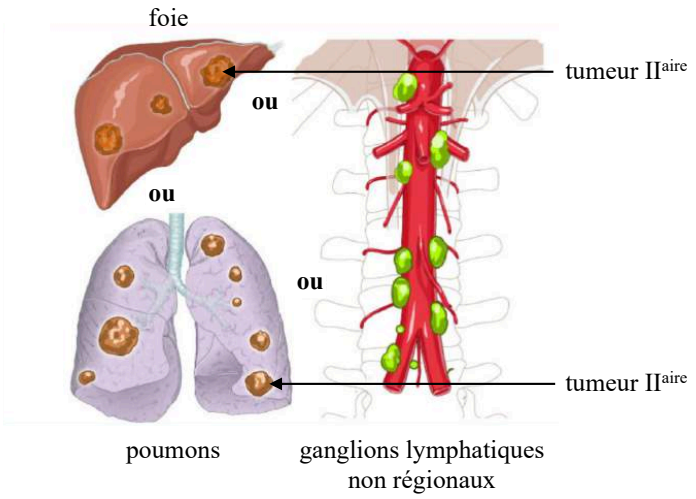
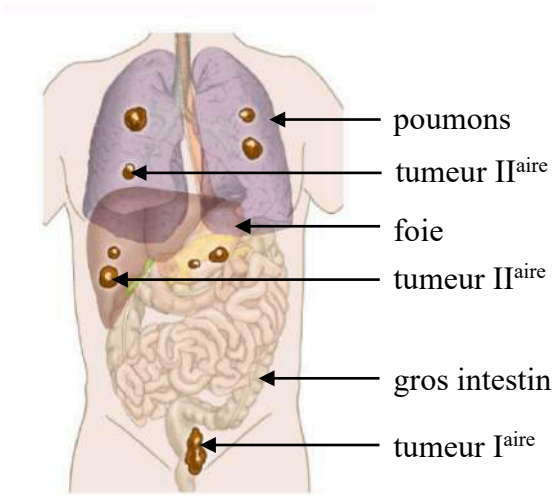
Tableau 2 : classification TNM – La lettre N

Source : adapté de Colorectal cancer staging, IMAIOS, Dr. Antoine Micheau

Licence CC BY-NC-ND 3.0

La lettre M est l'indicateur de présence de métastases à distance (Tableau 3)

Dans le cas des CCR, les cellules cancéreuses peuvent envahir d'autres ganglions lymphatiques non régionaux ou d'autres organes que le gros intestin et y développer un cancer secondaire. Les organes les plus souvent atteints par des métastases lors d'un CCR sont le foie, les poumons et le péritoine. Les CCR métastatiques ont un pronostic de survie extrêmement faible puisqu'ils sont très difficiles à traiter.

M0	Pas de métastase à distance	
M1	**M1a** : métastases dans un seul organe (foie, poumon, ganglion(s) lymphatique(s) non régional(aux))	
	M1b : métastases dans plus d'un organe sans atteinte péritonéale	

Licence CC BY-NC-ND 3.0

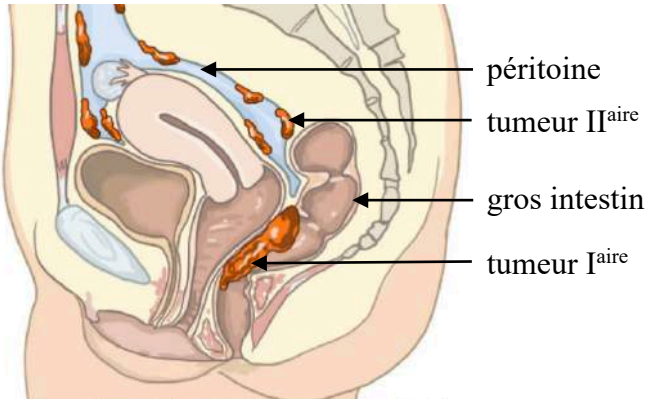
	M1c : métastases dans le péritoine avec ou sans atteinte d'un autre organe	

Tableau 3 : classification TNM – La lettre M

Source : adapté de Colorectal cancer staging, IMAIOS, Dr. Antoine Micheau

Les stades selon la classification TNM

La combinaison des critères TNM permet de définir des stades du CCR au moment du diagnostic allant du stade 0 au stade IV permettant de définir la meilleure stratégie thérapeutique à adapter afin d'obtenir les meilleures chances de guérison du patient atteint de CCR **(Tableaux 4 – 8)** (4).

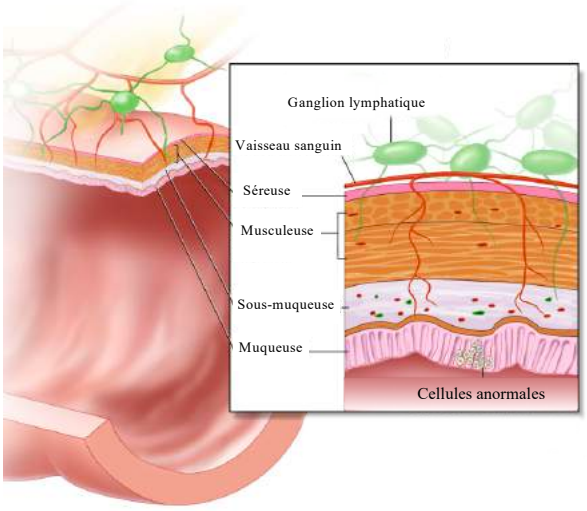
Stade 0	Tis – N0 – M0	

Tableau 4 : classification TNM – Stade 0

Source : adapté de Colon Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version (4)

Licence CC BY-NC-ND 3.0

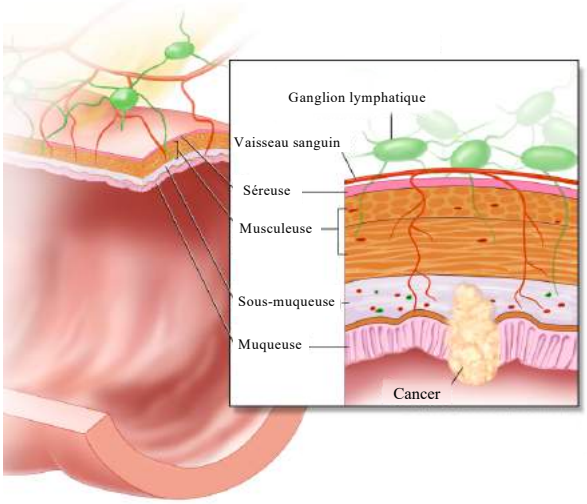
Stade I	T1, T2 – N0 – M0	

Tableau 5 : classification TNM – Stade I

Source : adapté de Colon Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version (4)

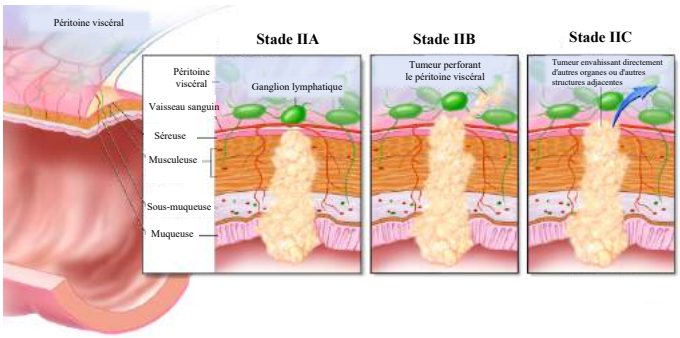
Stade IIA	T3 – N0 – M0	
Stade IIB	T4a – N0 – M0	
Stade IIC	T4b – N0 – M0	

Tableau 6 : classification TNM – Stades IIA, IIB et IIC

Source : adapté de Colon Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version (4)

Licence CC BY-NC-ND 3.0

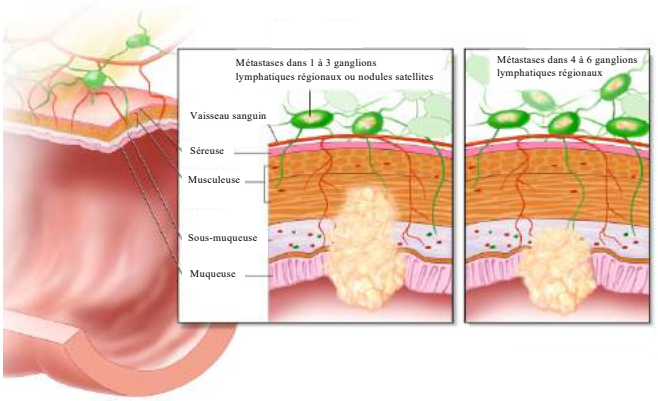
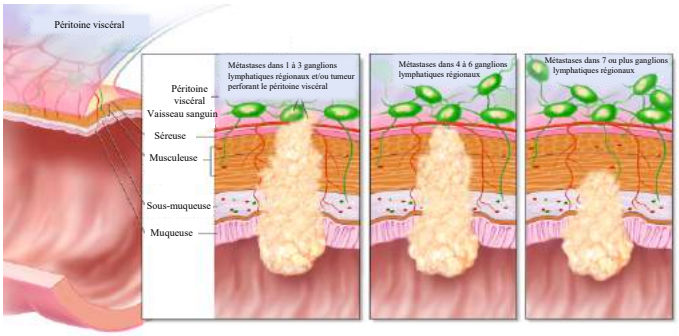
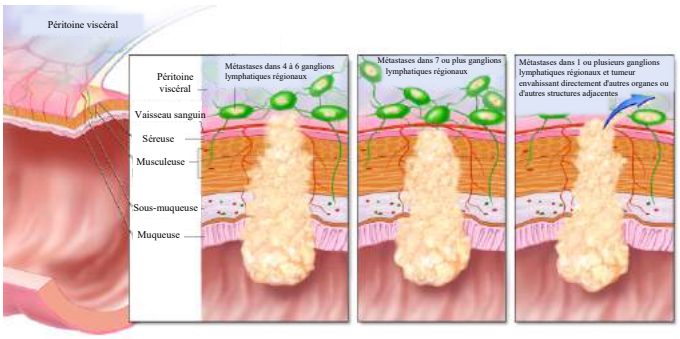
Stade IIIA	T1, T2 – N1 – M0	
	T1 – N2a – M0	
Stade IIIB	T3, T4a – N1 – M0	
	T2, T3 – N2a – M0	
	T1, T2 – N2b – M0	
Stade IIIC	T4a – N2a – M0	
	T3, T4a – N2b – M0	
	T4b – N1, N2 – M0	

Tableau 7 : classification TNM – Stades IIIA, IIIB et IIIC

Source : adapté de Colon Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version (4)

Licence CC BY-NC-ND 3.0

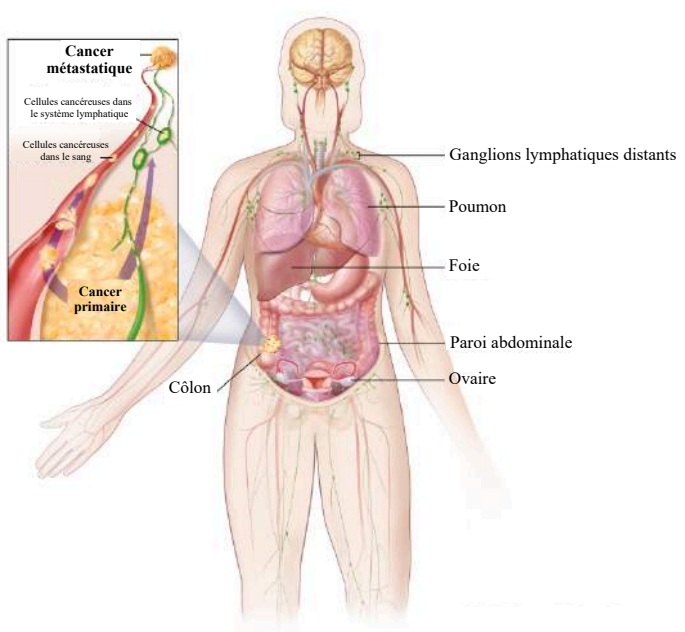
Stade IVA	Quel que soit T – Quel que soit N – M1a	
Stade IVB	Quel que soit T – Quel que soit N – M1b	
Stade IVC	Quel que soit T – Quel que soit N – M1c	

Tableau 8 : classification TNM – Stades IVA, IVB et IVC

Source : adapté de Colon Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version (4)

Classification OMS de l'état général

Lorsque le stade du CCR est déterminé par les médecins, les protocoles de traitements peuvent se mettre en place. Cependant, puisqu'ils sont plus ou moins lourds à supporter par le patient, une classification de l'état général du patient permet d'affiner ces traitements **(Tableau 9)**.

Classe 0	Capable d'une activité identique à celle précédant la maladie, sans aucune restriction
Classe 1	Activité physique diminuée mais ambulatoire et capable de mener un travail
Classe 2	Activité physique ambulatoire et capable de prendre soin de soi, incapable de travailler. Alité <50% de son temps
Classe 3	Capable de seulement quelques soins personnels. Alité ou chaise >50% du temps
Classe 4	Incapable de prendre soin de lui-même, alité ou chaise en permanence

Tableau 9 : classification OMS de l'état général

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.3. Les traitements

Lorsqu'un CCR est diagnostiqué chez un patient, l'équipe médicale doit définir un programme personnalisé de soins (PPS). Il est déterminé lors d'une réunion de concertation pluridisciplinaire regroupant notamment des radiologues, des radiothérapeutes, des oncologues et des chirurgiens digestifs. Le protocole de traitement est dépendant du type de cancer, de son stade ou de sa localisation ainsi que de l'âge et de l'état général du patient qui influent sur la capacité à supporter les effets secondaires du traitement (3–5). Selon ces différents critères, le PPS peut avoir différents objectifs :

- Guérir le CCR en supprimant la totalité des cellules cancéreuses ;
- Empêcher le CCR de se développer et de se propager ;
- Réduire le risque de récidive ;
- Améliorer le confort et la qualité de vie du patient. Cela consiste notamment à traiter les troubles causés par le CCR ou par les traitements et en diminuant les symptômes liés au CCR comme la douleur.

Selon toutes ces données, des recommandations thérapeutiques sont prévues : la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie (surtout dans le cancer du rectum) ou encore les thérapies ciblées **(Tableau 10)**. Dans certains cas, il est possible qu'une association de traitements soit nécessaire pour mieux traiter le CCR, comme notamment la réalisation d'une chirurgie complétée par une chimiothérapie. On parle alors de chirurgie locorégionale qui traite la tumeur où elle est située et d'une chimiothérapie adjuvante qui a pour objectif de compléter l'action du traitement principal comme notamment détruire les cellules tumorales résiduelles non enlevées par la chirurgie. Dans certains cas, une chimiothérapie peut être envisagée avant la chirurgie pour diminuer le volume de la tumeur, on parlera alors de chimiothérapie néo-adjuvante. Ces dernières décennies, de nouvelles thérapies se sont développées dans le but d'améliorer les traitements existants en augmentant leur efficacité, de diminuer les effets secondaires pour les patients en ciblant mieux les cellules tumorales ou pour essayer de combattre les CCR résistants aux traitements classiques par exemple. C'est le cas notamment de la chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale (CHIP), de la chimiothérapie intrapéritonéale pressurisée par aérosols (PIPAC), de la nanomédecine ou encore de la thérapie laser pour le traitement focal comme la thérapie photodynamique (PDT).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Stades 0 et I	Chirurgie : la partie du côlon atteinte est retirée.
Stade II	Chirurgie : la partie du côlon atteinte est retirée.
	Dans certains cas, une chimiothérapie adjuvante peut être envisagée en complément de la chirurgie, notamment si la tumeur présente des caractéristiques agressives (T3 ou T4).
Stade III	Chirurgie : la partie du côlon atteinte est retirée.
	Chimiothérapie adjuvante systématique puisqu'elle améliore significativement le pronostic de survie du CCR. Elle a pour but de réduire le risque de récidive. Selon le grade histologique et la localisation de la tumeur, une combinaison chimio-radiothérapie peut être envisagée.
Stade IV	Chirurgie : elle peut être envisagée sous 2 interventions. La première pour retirer la partie du côlon atteinte et la deuxième pour retirer la ou les métastases. Dans certains cas, l'opération n'est pas possible.
	Chimiothérapie : elle est réalisée soit entre les 2 chirurgies pour réduire la taille des métastases et faciliter leur exérèse, soit en traitement principal si le CCR ne peut pas être opéré.
	Thérapie ciblée : d'autres médicaments anticancéreux peuvent être associés à la chimiothérapie.

Tableau 10 : recommandations thérapeutiques prévues suivant le stade multicritère du cancer colorectal

I.3.1. La chirurgie

La chirurgie est le traitement de référence du CCR (6). L'intervention consiste à enlever la tumeur ainsi qu'une marge de sécurité d'au moins 5 cm autour afin d'éviter de laisser des cellules cancéreuses. Souvent, les deux extrémités restantes du côlon seront suturées entre elles afin de reconstituer un tube digestif fonctionnel, on parle d'anastomose. Cependant, dans certains cas, l'inflammation d'un des deux segments et le risque de rupture de la couture oblige le chirurgien à réaliser une colostomie. La colostomie consiste à suturer de façon temporaire ou permanente l'extrémité du côlon à la peau **(Figure 6)**. Les selles seront alors recueillies dans une poche spéciale collée sur le ventre. La localisation de la tumeur et son stade influent sur l'importance de la zone à retirer **(Figure 7)**. On parle d'hémicolectomie droite ou gauche lorsque la moitié droite ou gauche ainsi que la moitié adjacente du côlon transverse sont retirées. Lorsque la tumeur est située dans la partie sigmoïde du côlon, on parle de sigmoïdectomie. Cependant, dans certains cas, il est nécessaire de retirer la totalité du côlon, on parle alors de colectomie totale. Si le rectum est retiré, on parle de proctectomie. Dans la grande majorité des cas, il est nécessaire de réaliser un curage ganglionnaire, c'est à dire retirer les ganglions lymphatiques drainant la région colorectale puisqu'ils peuvent contenir quelques cellules cancéreuses qui auraient réussi à se disséminer.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Lorsque c'est réalisable, la chirurgie peut également être utilisée pour enlever les tumeurs métastatiques au niveau du foie et des poumons.

Figure 6 : la colostomie

Source : Ramsay générale de santé

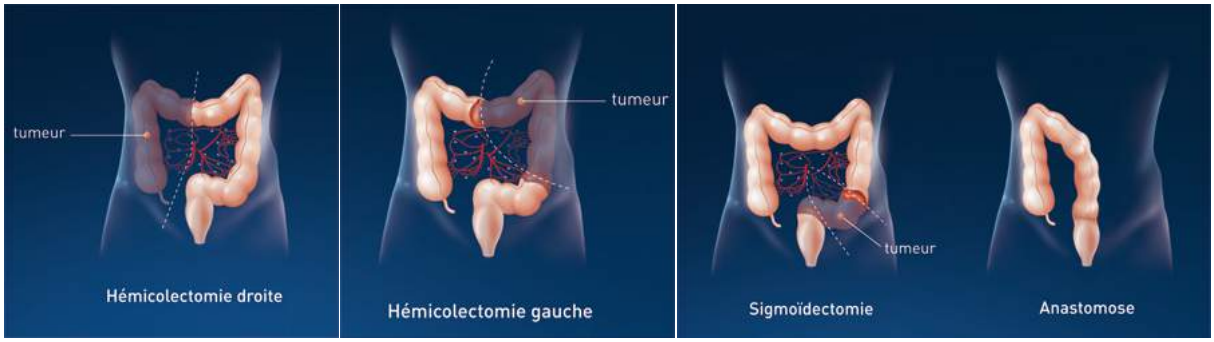


Figure 7 : les différentes colectomies

Source : Institut National du Cancer

La chirurgie se déroule sous anesthésie générale avec 2 possibilités **(Figure 8)** :

- La laparotomie : cette opération consiste à faire une incision dans la paroi abdominale afin d'avoir rapidement accès au gros intestin et aux structures voisines comme les ganglions lymphatiques. Lorsque l'opération est terminée, une suture permet de refermer la cavité abdominale.
- La cœlioscopie : cette technique permet d'éviter de faire une large incision au niveau de la paroi abdominale puisque seulement 3 ou 4 petits orifices d'environ un centimètre sont réalisés pour faire passer les instruments chirurgicaux et une petite caméra. L'extraction de la tumeur et des différents tissus adjacents sera réalisée par ces petits orifices. La cœlioscopie offre les mêmes résultats que la laparotomie mais en diminuant les douleurs post-opératoires, les complications ainsi que la durée d'hospitalisation du patient.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

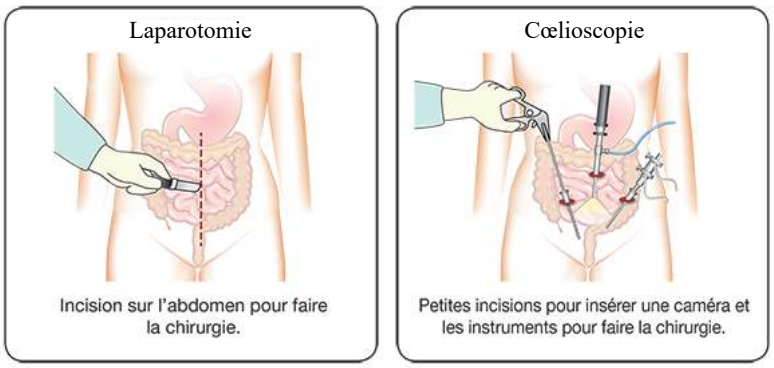


Figure 8 : laparotomie et cœlioscopie

Source : chirurgie colorectale / procédure / CHU de Québec - Université Laval

Les effets secondaires de la chirurgie sont systématiques puisqu'après une chirurgie du CCR, il est impossible de reprendre immédiatement une alimentation normale. Des perfusions nutritives sont d'abord nécessaires avant un retour progressif à une alimentation normale. Des antalgiques sont souvent prescrits afin de soulager les douleurs abdominales et des diarrhées parfois invalidantes peuvent persister pendant plusieurs mois après l'opération. Selon le stade du CCR, la chirurgie peut être curative pour les stades peu avancés mais dans d'autres cas il est nécessaire de l'associer à de la chimiothérapie afin de détruire les cellules cancéreuses résiduelles.

I.3.2. La chimiothérapie

La chimiothérapie consiste à administrer au patient une ou plusieurs molécules toxiques pour les cellules cancéreuses. Elle peut être donnée sous forme d'une seule molécule, on parle de monothérapie, ou sous forme d'une combinaison de molécules, on parle de polythérapie. La chimiothérapie peut être prescrite pour tous les stades du CCR mise à part pour les cancers *in situ* où la balance bénéfice-risque est trop faible (7). Elle peut être néo-adjuvante afin de diminuer la taille de la tumeur avant la chirurgie ou adjuvante pour détruire les cellules cancéreuses résiduelles et limiter les récidives. L'administration peut être orale mais le plus souvent elle est sous forme intraveineuse et de manière répétée. Ce dernier mode de dispensation requiert la pose chez le patient d'une chambre implantable ou port-à-cath® **(Figure 9)**. En effet, l'administration des molécules de chimiothérapie par les veines du bras peut être délicate puisque ces veines sont fragiles et les injections répétées deviennent rapidement douloureuses. Cette chambre implantable est placée sous la peau au niveau du thorax lors d'une courte intervention chirurgicale sous anesthésie locale. Elle permet l'injection par voie intraveineuse des différentes molécules en limitant les douleurs d'injections pour les patients.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

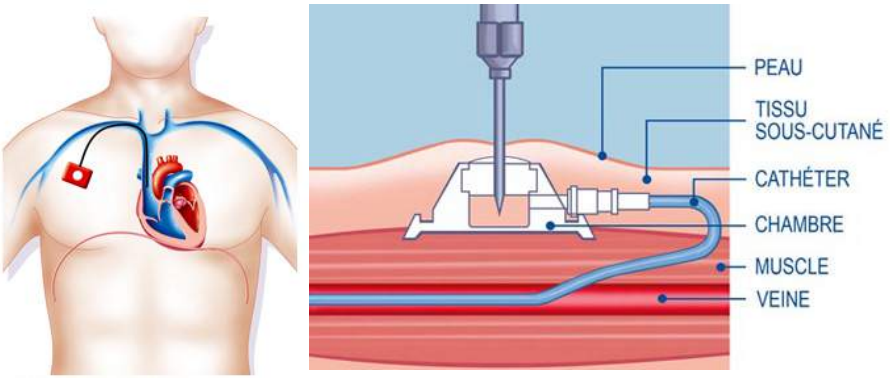


Figure 9 : port-à-cath®

Source : glossaire médical / chambre implantable / Hôpital Erasme - Université Libre de Bruxelles

On parle de chimiothérapie de première ligne lorsqu'elle est administrée chez le patient qui n'a pas encore reçu de chimiothérapie. Lorsqu'elle ne montre pas d'efficacité suffisante, une chimiothérapie de deuxième ligne est administrée au patient. C'est le cas également pour les patients présentant une récidive de leur cancer. Enfin lorsque malheureusement ces 2 lignes de chimiothérapie ne présentent pas de résultats satisfaisants, une chimiothérapie de troisième ligne ou de sauvetage est alors envisagée. Elle est également utilisée pour les patients rechutant de leur cancer. Il est possible d'avoir plusieurs autres lignes de chimiothérapie mais la troisième ligne de chimiothérapie est considérée comme l'étape de la dernière chance où les molécules non encore utilisées sont administrées au patient. Quel que soit la ligne de traitement, il existe plusieurs protocoles de traitement qui sont adaptés au cas par cas selon les patients. Après l'analyse anatomopathologique de la tumeur et des différents tissus retirés, l'équipe médicale s'oriente vers une stratégie plutôt qu'une autre. Cependant, le patient peut ne pas supporter les effets secondaires d'une molécule ou ne pas répondre à l'effet anticancéreux de cette dernière obligeant l'adaptation des traitements.

La chimiothérapie de première ligne

- Le protocole FOLFOX : c'est le protocole le plus souvent préconisé en cycles de 14 jours. C'est une association de 2 molécules cytotoxiques, le 5-fluorouracil (5-FU) et l'oxaliplatine (Eloxatine™), associées à la leucovorine (Lederfoline™). La leucovorine ou acide folinique est le métabolite actif de l'acide folique. Cette association augmente l'activité cytotoxique du 5-FU. Le 5-FU, en tant qu'analogue de la pyrimidine, est transformé au sein de la cellule en métabolites cytotoxiques. Il est métabolisé d'une part en 5-fluorodésoxyuracile monophosphate (5-FdUMP) bloquant l'activité de la thimidylate synthase donc de la synthèse de l'ADN et d'autre part en 5-fluorouridine triphosphate (5-FUTP) incorporant des erreurs dans la transcription de l'acide ribonucléique (ARN). Ces métabolites vont ainsi conduire à un arrêt du cycle cellulaire et à l'apoptose des cellules. L'oxaliplatine inhibe la synthèse et la réplication de l'ADN par la formation de ponts intra et inter-brins entre 2 guanines adjacentes. Ce protocole FOLFOX existe sous différentes formes variant sur les doses ou temps d'administration des molécules.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

- Le protocole FOLFIRI : c'est une alternative au protocole FOLFOX. Il consiste en une association de 2 molécules cytotoxiques associées à l'acide folinique. Contrairement au protocole FOLFOX, l'oxaliplatine est remplacée par l'irinotécan (Campto™). Le métabolite actif de l'irinotécan inhibe la topoisomérase 1 induisant des cassures de l'ADN.
- Le protocole XELOX : ce protocole remplace le 5-FU par la capécitabine (XELODA™). Elle a l'avantage de pouvoir être administrée par voie orale et de ne pas nécessiter l'administration conjointe d'acide folinique. La capécitabine est associée à l'oxaliplatine dans ce protocole. Elle appartient à la famille des fluoropyrimidines comme le 5-FU mais elle est non cytotoxique. Elle se comporte comme un précurseur du 5-FU et possède donc le même mécanisme d'action.
- Le protocole TEGAFUR-URACILE : ce protocole utilise également un précurseur du 5-FU, le tégafur (UFT™) et l'uracile qui permet d'empêcher la dégradation du 5-FU décuplant son efficacité. Ce protocole est également possible par voie orale mais nécessite la prise d'acide folinique.

La chimiothérapie de deuxième ligne

Lorsque la chimiothérapie de deuxième ligne est envisagée, les polychimiothérapies sont le plus souvent préconisées. Elles consistent en l'association de molécules chimiothérapeutiques non utilisées en chimiothérapie de première ligne. Il existe cependant quelques nouvelles options comme l'association de la trifluridine, un analogue nucléosidique de la thymidine, au tipiracil, un inhibiteur de la thymidine phosphorylase limitant la dégradation de la trifluridine (Lonsurf™). La trifluridine est phosphorylée par la thymidine kinase puis incorporée dans l'ADN, inhibant la prolifération des cellules cancéreuses. Le raltitrexed (Tomudex™) est également une nouvelle option en tant qu'analogue de l'acide folique. De par sa puissante activité inhibitrice envers la thymidilate-synthase, la synthèse *de novo* de la thymidine triphosphate n'est plus possible entraînant une fragmentation de l'ADN des cellules cancéreuses.

Les effets secondaires de la chimiothérapie sont dépendants des molécules utilisées, de la dose ainsi que de la durée. Les traitements sont de mieux en mieux tolérés par les patients grâce à l'association de molécules prévenant ou limitant les effets secondaires. Les principaux effets secondaires sont les vomissements ; des anti-nauséeux sont donc systématiquement associés à la chimiothérapie. Des inflammations au niveau des muqueuses, des diarrhées importantes ou des fourmillements au niveau des extrémités sont également très fréquents. Malgré des effets secondaires modérés, il en existe des plus graves comme la diminution de la production des cellules sanguines. Suite aux traitements comportant de l'irinotécan ou de l'oxaliplatine, l'arrêt ou l'espacement des cures de chimiothérapie est nécessaire afin de renouveler le stock de cellules sanguines grâce à des facteurs de croissance stimulant la moelle osseuse.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.3.3. La radiothérapie

La radiothérapie est l'utilisation de rayons ou de particules à haute énergie pour détruire les cellules cancéreuses. Elle est très souvent utilisée pour traiter les cancers du rectum, c'est même le traitement standard en complément de la chirurgie, mais plus rarement pour les cancers du côlon où elle est seulement utilisée dans les cas où la tumeur est trop importante ou difficile à opérer. Il existe 2 types de radiothérapie : la radiothérapie externe (RTE), extrêmement utilisée, et la curiethérapie ou brachythérapie, plus rarement. Comme la chimiothérapie, la radiothérapie peut être utilisée de façon néo-adjuvante afin de diminuer de façon significative la tumeur avant le geste chirurgical ou de façon adjuvante pour détruire les cellules cancéreuses résiduelles à la chirurgie et de diminuer le risque de récidives locales. Comme la chimiothérapie, la radiothérapie peut engendrer des effets secondaires mais de façon plus modérée. Les effets de la radiothérapie sur les cellules saines du patient sont plus limités mais il est quand même possible que certaines soient touchées. Les effets secondaires de la radiothérapie sont notamment une rougeur de la peau à cause de l'irradiation, des troubles urinaires, de la fatigue, des nausées et vomissements et des saignements du rectum. Ils dépendent surtout de la dose totale délivrée, de la taille et de l'endroit où se trouve la région traitée.

La radiothérapie externe

La RTE utilise un accélérateur linéaire de particules produisant des rayons X haute énergie dirigés vers la tumeur en traversant la peau en vue de détruire l'ADN des cellules tumorales. Il existe différents types de RTE mais c'est la radiothérapie conformationnelle qui est le plus souvent utilisée. Cette technique est définie comme étant une irradiation transcutanée s'appuyant sur des images 3D définissant avec une extrême précision la forme de la tumeur et la zone à irradier **(Figure 10)**. Cela permet une meilleure préservation des tissus sains et des organes à risque voisins. Ainsi, par cette irradiation très précise, la dose totale délivrée au volume tumoral peut donc être augmentée et va donc permettre d'améliorer significativement le pronostic de survie des patients. La RTE est le plus souvent réalisée en ambulatoire sous forme d'une séance par jour, 4 à 5 jours consécutifs, pendant 5 semaines.

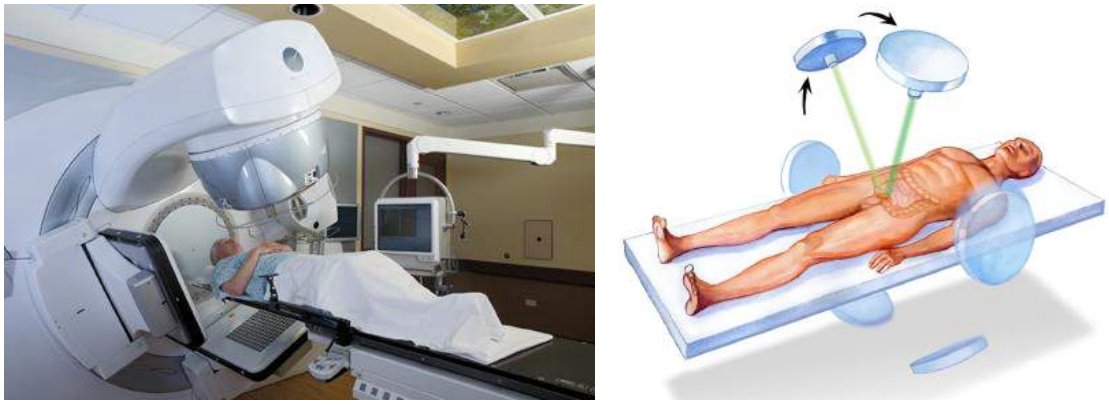


Figure 10 : la radiothérapie externe

Source : Colorectal Surgeons Sydney

Licence CC BY-NC-ND 3.0

La curiethérapie

La curiethérapie ou brachythérapie est un type de radiothérapie interne. Elle consiste à placer une substance radioactive, appelée radio-isotope, comme l'iridium 192 directement au contact de la tumeur, à l'intérieur du corps du patient **(Figure 11)**. L'irradiation sera donc uniquement interne dans une zone très localisée, on parle de radiothérapie endocavitaire ou endoluminale, ce qui permet de réduire efficacement l'exposition aux radiations des tissus sains à proximité. Cette technique permet de délivrer des doses très élevées de radiations par rapport à la RTE, augmentant les chances de survie du patient et limitant fortement les effets secondaires indésirables de la RTE du fait des radiations localisées. La curiethérapie est également réalisée en ambulatoire.

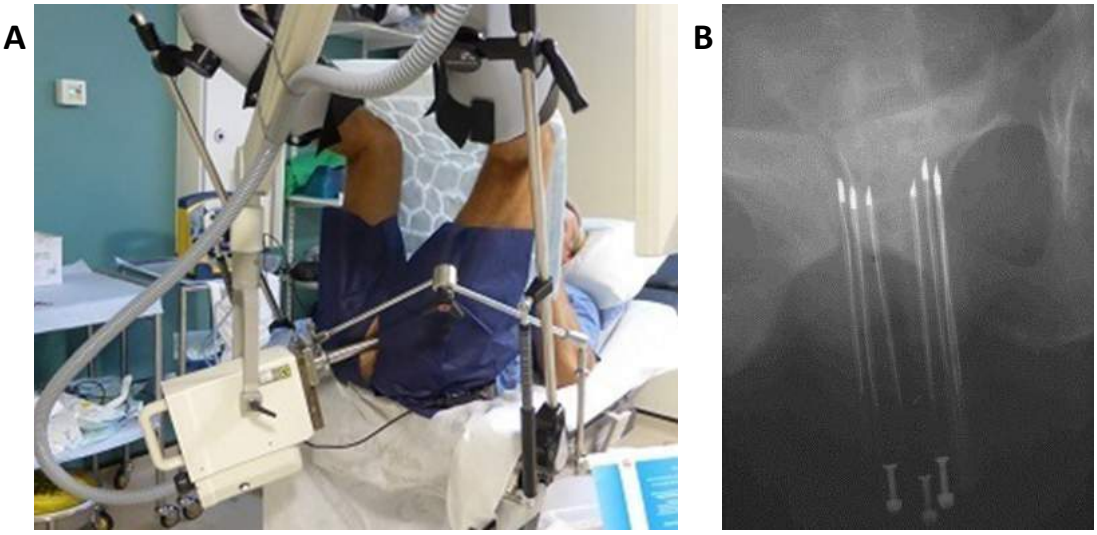


Figure 11 : la curiethérapie

A : positionnement du patient lors d'une curiethérapie d'un cancer colorectal. B : radiographie des gaines contenant les radio-isotopes insérés au niveau rectal chez le patient. Source : Belliere *et al.*, 2003 (8) et Sun Myint *et al.*, 2017 (9)

I.3.4. Les thérapies ciblées

Depuis plusieurs années, une nouvelle classe de médicaments est utilisée souvent en association aux chimiothérapies classiques (10). On parle de traitements ciblés puisque contrairement aux chimiothérapies classiques qui limitent la multiplication des cellules, ces thérapies ciblées visent les mécanismes de la cancérisation des cellules. Par conséquent, les effets secondaires sur les cellules saines sont diminués. Actuellement en clinique, il existe 2 catégories de thérapies ciblées. La première agit sur l'angiogenèse : en bloquant la croissance des vaisseaux sanguins, la tumeur n'est plus alimentée en nutriments et en oxygène nécessaires à sa croissance ce qui permet de freiner son développement voire d'entraîner la mort des cellules cancéreuses. La seconde catégorie agit sur les facteurs de croissance des cellules : l'inhibition de ces facteurs entraîne une diminution de la division des cellules et donc l'arrêt du développement tumoral. Ces thérapies ciblées sont actuellement autorisées pour les CCR de hauts grades avec métastases.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Les anti-angiogéniques

Le plus connu des anti-angiogéniques pour le traitement des CCR est un anticorps monoclonal, le bevacizumab (AVASTIN™). Il a pour rôle de bloquer l'interaction du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) sécrété par les cellules tumorales avec son récepteur (VEGFR). Le VEGF ne pouvant plus activer l'angiogenèse, la tumeur sera privée d'oxygène et de nutriments bloquant ainsi sa progression **(Figure 12)**.

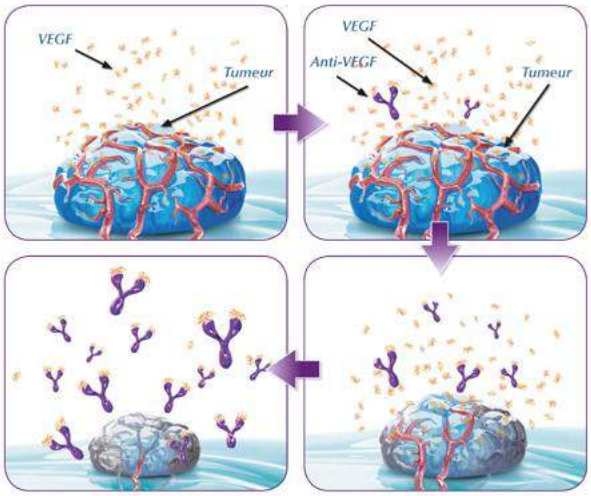


Figure 12 : mode d'action du bevacizumab

Une thérapie anti-angiogénique bloque l'action de la protéine VEGF. La tumeur ne peut alors plus se nourrir et est asphyxiée.
Source : Dr. Cosyns, UZ Brussel

Il existe 2 autres molécules homologuées pour le traitement des CCR. L'aflibercept (ZALTRAP™) qui est une protéine de fusion composée à partir du VEGFR. Ce traitement agit comme un récepteur "leurre" pour le VEGF synthétisé par les cellules tumorales et avec une plus grande affinité que le VEGFR cellulaire. Le régorafénib (STIVARGA™) est lui un nouvel inhibiteur multikinase qui a pour rôle de bloquer de nombreuses protéines kinases comme notamment celles impliquées dans l'angiogenèse tumorale.

Les inhibiteurs du récepteur du facteur de croissance épidermique

Les 2 molécules autorisées sont 2 anticorps monoclonaux, le cetuximab (ERBITUX™) et le panitunumab (VECTIBIX™). Ces molécules ont pour rôle de se lier, par leur plus forte affinité, au récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) en bloquant sa signalisation et donc la division des cellules tumorales. En pratique, ces thérapies ciblées ne sont prescrites qu'après une recherche d'altérations génétiques chez le patient puisqu'elles peuvent conduire à provoquer une résistance au traitement. C'est le cas chez les patients porteur d'une mutation du gène *KRAS*. Chez ces patients, la protéine RAS est constamment phosphorylée conduisant à un signal proliferatif indépendant des récepteurs de surface tels que l'EGFR rendant complétement inefficace l'utilisation d'anticorps anti-EGFR.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

En comparaison aux chimiothérapies classiques, les thérapies ciblées sont bien tolérées par les patients. Une hypertension artérielle modérée peut être fréquente chez les patients et dans quelques cas des problèmes plus importants au niveau sanguin peuvent survenir du fait de l'utilisation des anti-angiogéniques.

I.3.5. Les nouvelles thérapies

La chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale

La CHIP est une technique d'amélioration du traitement chimiothérapeutique classique pour les patients atteints de carcinose péritonéale, c'est à dire un CCR de stade IVC. Depuis les années 2000, cette nouvelle stratégie associant une chirurgie de cytoréduction suivie d'une chimiohyperthermie intrapéritonéale a permis d'améliorer la survie des patients. Il a été montré une augmentation de la survie médiane des patients de 12,6 mois pour un traitement par chimiothérapie à base de 5-FU ou d'un protocole type FOLFOX ou FOLFIRI contre 22,2 mois pour les patients traités par une chirurgie de cytoréduction suivie d'une CHIP (11,12). Cette technique consiste après la chirurgie d'exérèse, à réaliser un bain hyperthermique de chimiothérapie. Elle peut se faire à ventre ouvert, c'est la technique du "coliseum" **(Figure 13)** ou à ventre fermé (13,14) mais immédiatement après la chirurgie pour éviter que les cellules cancéreuses résiduelles à la chirurgie ne soient piégées dans les adhérences post-opératoires. La température du bain hyperthermique doit être comprise entre 41°C et 43°C au maximum afin d'éviter le risque de perforation digestive. La durée est variable entre 30 à 90 minutes mais il est important que la température et la diffusion du bain soient homogènes dans toute la cavité abdominale. Les principales molécules utilisées sont l'oxaliplatine qui est régulièrement potentialisée par une administration systémique de 5-FU, on parle de chimiothérapie bi-directionnelle, ou la mitomycine C qui est un agent alkylant comme l'oxaliplatine. La CHIP est un traitement lourd ne permettant pas à tous les patients de pouvoir y prétendre. Il existe plusieurs règles à respecter pour bénéficier d'une CHIP comme notamment avoir un statut OMS inférieur à 2, être âgé de moins de 65 ans ou avoir une atteinte péritonéale localisée.

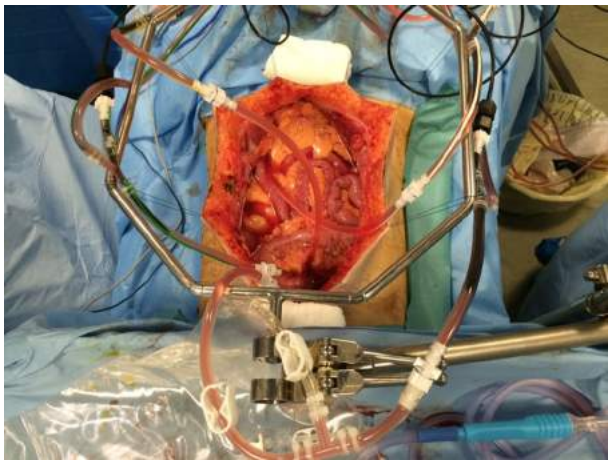


Figure 13 : la chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale à ventre ouvert

Source : Dagois *et al.*, 2015 (15)

Licence CC BY-NC-ND 3.0

La chimiothérapie intrapéritonéale pressurisée par aérosols

Cette nouvelle technique, utilisée pour la première fois en clinique en 2016, consiste à vaporiser de la chimiothérapie directement dans la cavité abdominale du patient par laparoscopie **(Figure 14)**. La PIPAC est une technique alternative à la CHIP. Ce traitement complémentaire peut être proposé aux patients trop fragiles pour supporter une CHIP ou avec une carcinose péritonéale trop étendue. Cette technique innovante repose sur la nébulisation de la chimiothérapie grâce à un injecteur haute pression permettant par l'action combinée des molécules chimiothérapeutiques et de l'hyperpression du pneumopéritoine une distribution homogène et une pénétration en profondeur du traitement. La PIPAC permet donc une diminution des doses conventionnelles de chimiothérapie par rapport à la CHIP, limitant ainsi les effets secondaires.

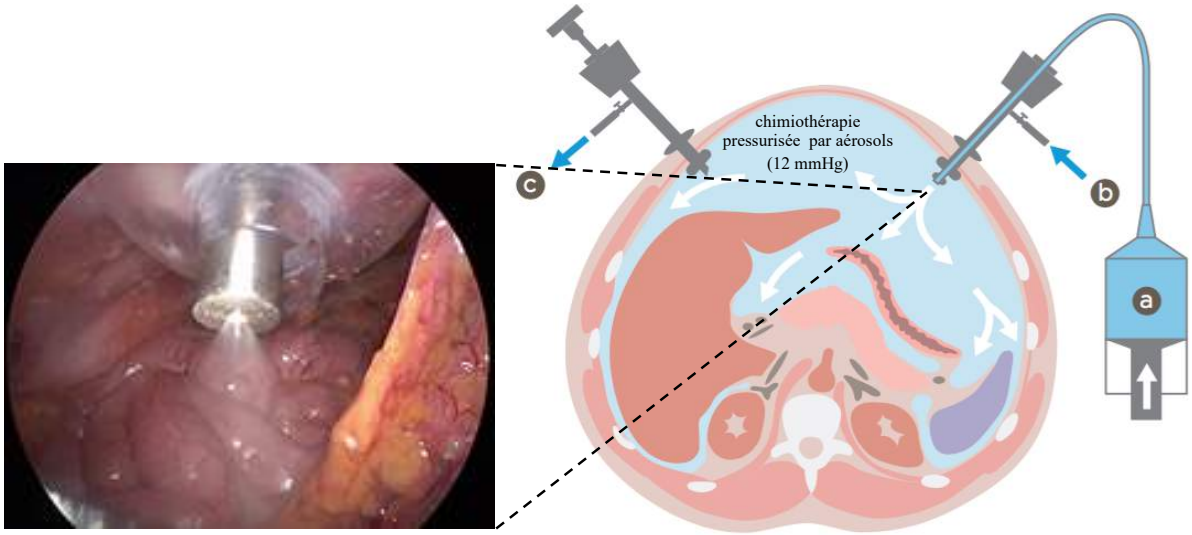


Figure 14 : la chimiothérapie intrapéritonéale pressurisée par aérosols

L'agent chimiothérapeutique (a) est vaporisé à haute pression dans la cavité abdominale grâce à un insufflateur de CO_2 (b) au niveau du premier trocart. Le second trocart permet le suivi endoscopique ainsi que l'aspiration de l'aérosol dans un système fermé pour filtration (c). Source : adapté de Kuchen *et al.*, 2018 (16)

La nanomédecine

Depuis quelques années, la question de l'amélioration des traitements anticancéreux par la découverte de nouvelles molécules uniquement est remise en cause. En effet, le problème majeur des molécules chimiothérapeutiques est leur ciblage des cellules tumorales. Les molécules injectées, le plus souvent par voie systémique, se dispersent dans tout le corps du patient induisant de nombreux effets secondaires au niveau des cellules saines. La nanomédecine repose sur l'idée de rendre plus efficace et moins toxique les traitements anticancéreux. L'utilisation de nanoparticules, d'une taille de 1 à 1000 nm, transportant à leur surface ou par encapsulation des molécules anticancéreuses permet une meilleure distribution du traitement au niveau de la tumeur et une diminution des effets secondaires. Ce principe basé sur des nanoparticules est également utilisé pour augmenter les effets anticancéreux de la radiothérapie.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

La thérapie laser pour le traitement focal

Depuis maintenant plusieurs décennies, une nouvelle stratégie thérapeutique anticancéreuse avec pour objectif la diminution drastique des effets secondaires des traitements conventionnels tente de se développer. Cette stratégie utilise une nouvelle source d'énergie, la lumière, on parle de thérapie laser. Cette technologie s'articule autour de la PDT qui permet d'une part le traitement anticancéreux et d'autre part le photodiagnostic (PD) permettant ainsi une meilleure détection des cellules cancéreuses. La thérapie laser concerne également la photothermie (PTT) qui en s'associant avec la nanomédecine, par des nanoparticules métalliques, permet l'échauffement important de ces dernières et conduit à la mort des cellules cancéreuses. La pénétration de la lumière dans les tissus n'étant pas homogène selon la longueur d'onde utilisée, les dommages tissulaires induits sont fonction de cette longueur d'onde utilisée **(Figure 15)**. La lumière rouge permet une meilleure pénétration dans les tissus mais les molécules capables d'absorber la lumière ne sont pas toujours activées ou efficaces à cette longueur d'onde.

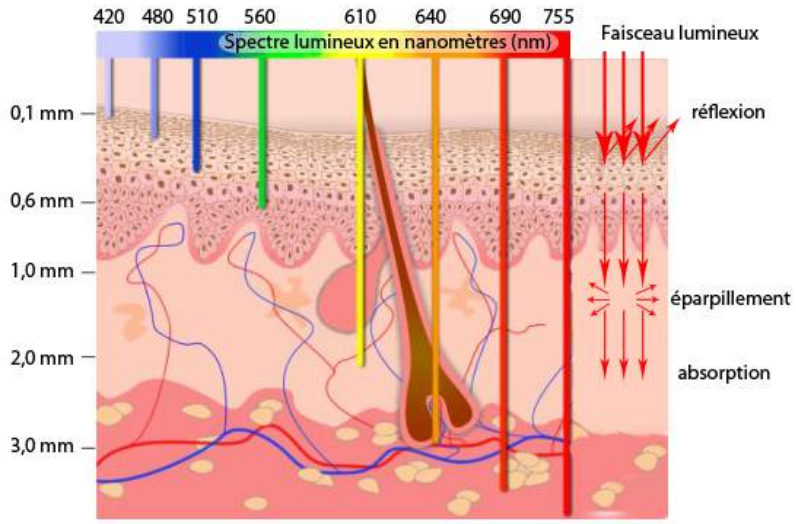


Figure 15 : propagation de la lumière de différentes longueurs d'onde dans les tissus

Source : La lumière contre le cancer / Réflexions - Université de Liège

La thérapie laser pour le traitement focal des cancers que ce soit la PDT ou la PTT est autorisée en clinique pour certains types de cancers, notamment pour les cancers dermatologiques. Pour d'autres types de cancers, comme le CCR, elle est encore au stade d'innovation thérapeutique, c'est à dire qu'elle n'est pas encore autorisée comme traitements des cancers mais est en phase d'essais cliniques. Cette thérapie laser se présente comme une stratégie thérapeutique limitant fortement les effets secondaires indésirables des traitements conventionnels ainsi qu'une nouvelle piste pour les nombreux cas de récidive ou de résistance aux chimiothérapies actuelles (17).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Chapitre II. La thérapie photodynamique

II.1. Principe de la thérapie photodynamique

La PDT à visée anticancéreuse est une innovation thérapeutique résidant sur une relative sélectivité de la molécule photosensible utilisée vis-à-vis des cellules tumorales permettant leur destruction tout en préservant les tissus sains avoisinants et ainsi limitant les effets secondaires. La PDT consiste en l'administration d'un produit appelé photosensibilisateur (PS) dénué de toute toxicité à l'obscurité. Une fois le PS accumulé préférentiellement au niveau des cellules tumorales, une activation lumineuse également non toxique est nécessaire pour permettre l'induction d'une cascade de réactions chimiques oxydatives à l'origine de la destruction de la tumeur **(Figure 16)**.

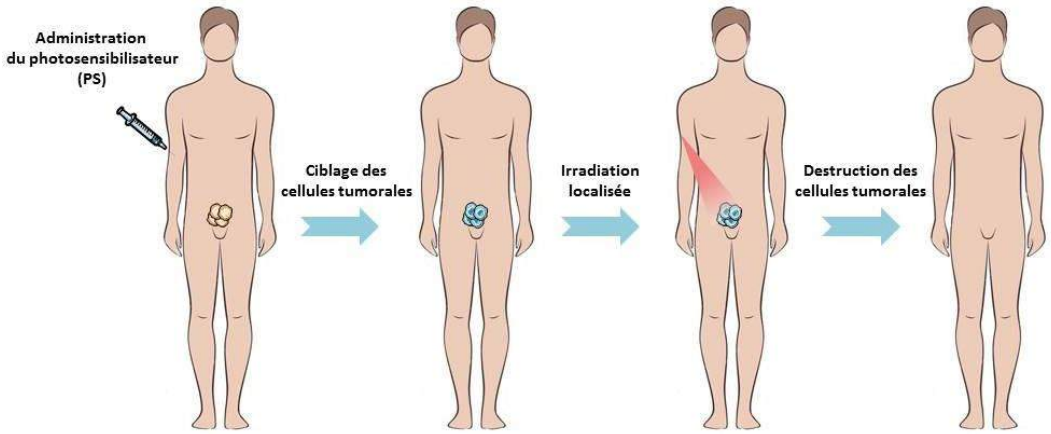


Figure 16 : principe de la thérapie photodynamique

Source : manuscrit de thèse Chloé Fidanzi-Dugas, 2016

Le développement de la PDT à visée anticancéreuse repose sur l'affinité tumorale du PS. Bien que le différentiel entre tissu sain et tissu cancéreux soit relativement faible, il est suffisant pour que l'effet cytotoxique de la PDT se manifeste essentiellement au niveau des cellules tumorales. Son développement est également basé sur une irradiation sélective de la zone tumorale limitant la photoactivation des PS non accumulés dans la zone d'intérêt et donc par conséquent limitant fortement les effets secondaires indésirables en comparaison des traitements chimiothérapeutiques conventionnels.

II.2. Les mécanismes de la thérapie photodynamique

Les propriétés photochimiques des PS et l'utilisation de longueurs d'onde appropriées confèrent à cette technique deux aspects thérapeutiques distincts **(Figure 17)** (18,19) :

Licence CC BY-NC-ND 3.0

- La photothérapie qui, par ciblage préférentiel du PS au niveau tumoral et par son activation par une lumière de longueur d'onde appropriée, va induire des réactions chimiques oxydatives aboutissant à la destruction des cellules tumorales.
- Le photodiagnostic qui, par l'excitation du PS par une lumière de longueur d'onde spécifique, va émettre une fluorescence. Cela va permettre une meilleure détection des lésions cancéreuses parfois invisibles à l'œil nu lors de la chirurgie augmentant ainsi l'efficacité des traitements et donc la survie des patients.

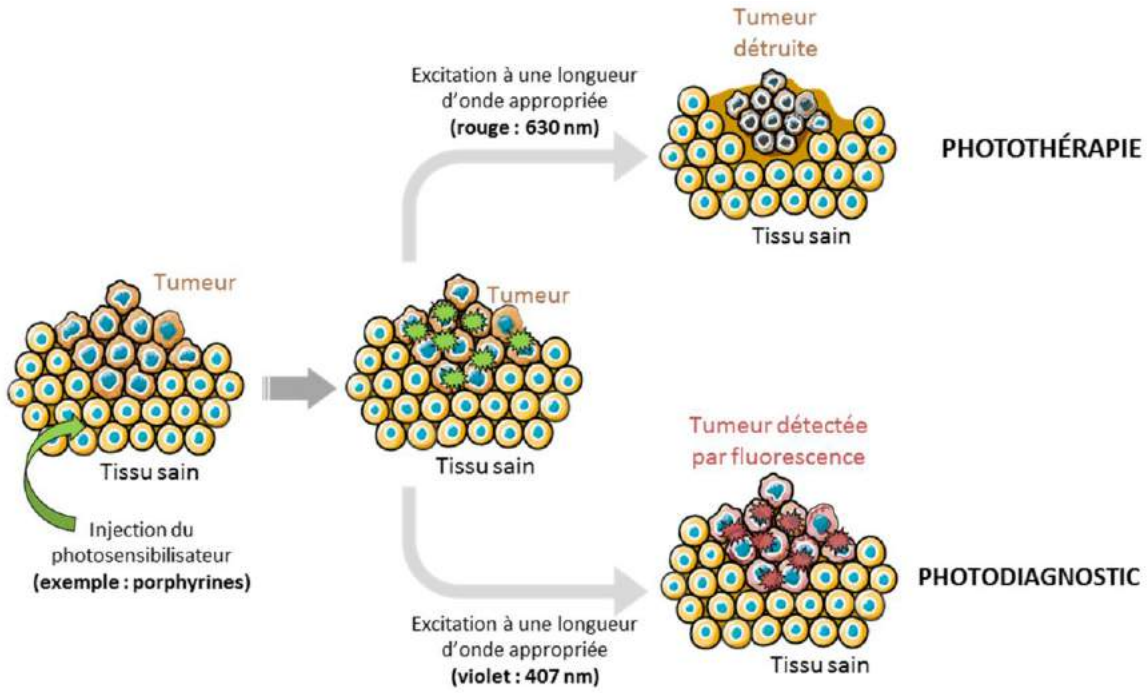


Figure 17 : principe des 2 composantes de la thérapie photodynamique : la photothérapie et le photodiagnostic

L'excitation d'un même photosensibilisateur à des longueurs d'onde différentes peut permettre à la fois la destruction de la tumeur par réaction oxydative mais aussi la détection de cette tumeur par fluorescence. Source : manuscrit de thèse Chloé Fidanzi-Dugas, 2016

Le PD consiste en l'analyse de la fluorescence émise par le PS. Comme il est plus sélectif envers les tissus cancéreux que les tissus sains, sa fluorescence émise lorsqu'il est excité par une lumière de longueur d'onde spécifique va permettre la détection avec précision des lésions cancéreuses chez un patient. Le PD représente une aide précieuse en matière de chirurgie per-opératoire car il permet de guider le chirurgien afin de réaliser une résection avec des marges saines limitant une possible récidive. Il permet également en amont, une détection plus précoce des lésions tumorales lors de dépistages endoscopiques. En effet, l'utilisation de PS comme l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) métabolisé en porphyrines fluorescentes comme la protoporphyrine IX (PpIX) permet d'améliorer la détection des tumeurs vésicales superficielles peu ou invisibles en lumière blanche lors de cystoscopie **(Figure 18)** (20).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

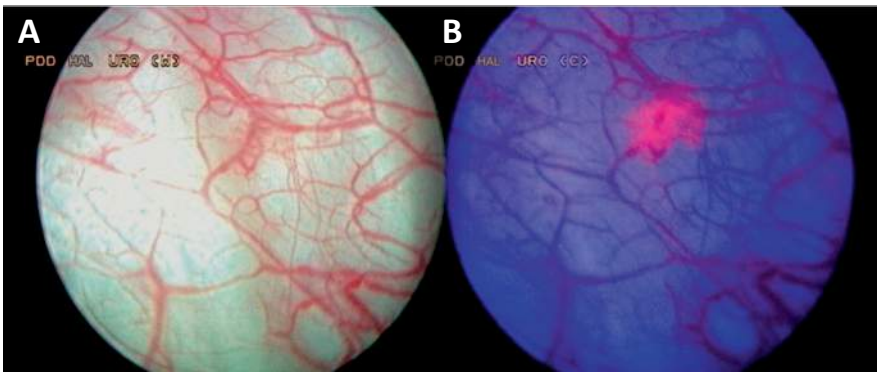


Figure 18 : détection de tumeurs superficielles de la vessie lors d'une cystoscopie en fluorescence

A : image en lumière blanche. B : image en lumière bleue. La fluorescence rose permet de visualiser la tumeur non visible en lumière blanche, le patient a reçu de l'hexaminolévulinate (Hexvix®) 1 h avant l'intervention de diagnostic. Source : Dimitri Vordos Progrès en Urologie – FMC Vol.19 n°1 2009

Du fait de l'importance de l'ablation chirurgicale complète de la tumeur en cancérologie relatif aux facteurs de pronostiques du patient, la chirurgie guidée par fluorescence occupe une place déterminante. En effet, il est parfois difficile de déterminer les marges précises de la tumeur lors de la chirurgie limitant à environ 50% le nombre d'interventions réussies, c'est à dire l'absence totale de cellule cancéreuse lors de l'examen anatomopathologique au niveau des marges saines excisées **(Figure 19)**. Plusieurs études cliniques ont montré l'efficacité de la chirurgie guidée par fluorescence. C'est notamment le cas au niveau de la chirurgie du glioblastome dans une étude sur 243 patients avec administration de 5-ALA. Cette étude clinique de phase III a démontré une augmentation significative de l'incidence de résection complète passant de 65% contre 36% avec une augmentation de la survie sans progression des patients (21). Une autre étude utilisant cette fois-ci la fluorescéine a démontré une résection complète dans plus de 80% des patients traités (22). D'autres études cliniques décrivent, par l'utilisation du bleu de méthylène ou du vert d'indocyanine, l'intérêt de cette technique au niveau des cancers de la tête et du cou (23) ou des cancers du sein (24). En effet, une faible injection intraveineuse de bleu de méthylène a permis de détecter des adénomes parathyroïdiens indétectables sans cette méthode (25). L'utilisation de la fluorescence du vert d'indocyanine a permis de montrer des lésions cancéreuses du sein indétectables par palpation (26).

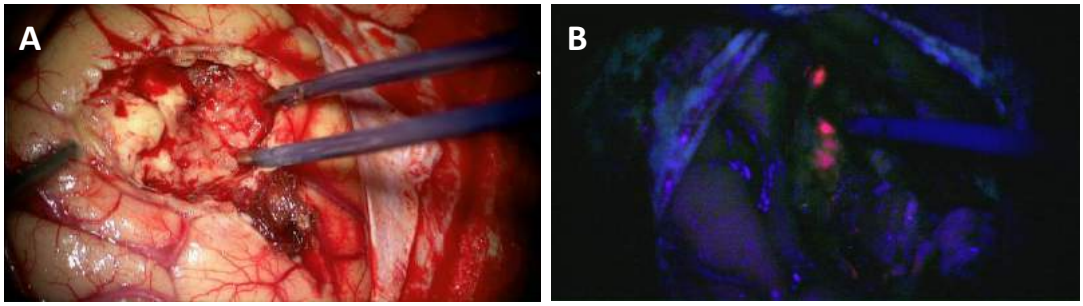


Figure 19 : résection chirurgicale d'un glioblastome par photodiagnostic

A : image en lumière blanche. B : image en lumière bleue. La fluorescence rose permet de visualiser la tumeur résiduelle, le patient a reçu le 5-ALA 3 h avant l'intervention chirurgicale. Source : Pr. Reyns, CHRU de Lille

Licence CC BY-NC-ND 3.0

La PDT à visée anticancéreuse consiste quant à elle à la destruction sélective des tissus cancéreux par un mécanisme d'oxydation irréversible (27). Il existe 2 modes d'administration du PS : une application locale sous forme de crème, d'émulsion ou d'injection sous-cutanée et une application systémique où le PS est administré par voie intraveineuse ou orale. Dans les 2 cas, après administration du PS, il va se concentrer préférentiellement au sein des tissus cancéreux. Par une stimulation lumineuse activant le PS, une cascade de réactions photochimiques oxydatives va être mise en jeu induisant ainsi la mort des cellules tumorales. La PDT utilisant la voie d'administration systémique présente une faible sélectivité du PS envers les cellules tumorales en comparaison d'une administration topique. Cette faible sélectivité est à l'origine d'une photosensibilité généralisée et prolongée des patients traités du fait de l'accumulation du PS au niveau de la peau (28). C'est pourquoi à ce jour en clinique, la PDT topique est très utilisée en dermatologie ou en cancérologie et notamment pour le traitement des mélanomes mais peine à se développer pour le traitement d'autres cancers. Néanmoins, grâce aux progrès de la recherche, l'amélioration de la sélectivité du PS par rapport aux cellules tumorales ouvre les champs d'application de la PDT à visée anticancéreuse aux tumeurs solides plus profondes.

II.3. Les réactions photochimiques

La terminologie "action photodynamique" en photothérapie est réservée aux PS consommant de l'oxygène moléculaire. Les acteurs essentiels de la PDT à visée anticancéreuse sont au nombre de 3 : le PS, la lumière et l'oxygène **(Figure 20)** (29).

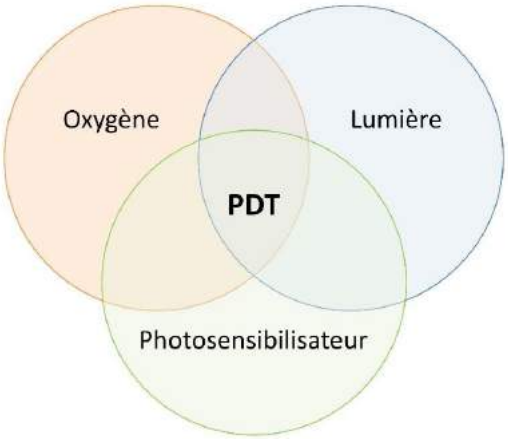


Figure 20 : les 3 fondamentaux de la thérapie photodynamique

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

Lorsque le PS est excité par absorption de la lumière, il va passer de son état fondamental, c'est à dire de l'état stable (P_0 ou S_0) à un état singulet excité de haute énergie ($^nP^*$ ou S_n) mais de très courte durée de vie, environ 10^{-15} s. Le PS va ensuite être stabilisé par conversion interne à un niveau d'excitation de plus faible énergie ($^1P^*$ ou S_1).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

L'excès d'énergie pour permettre le retour du PS à son état fondamental stable est restitué selon 3 mécanismes :

- Par dégagement de chaleur ;
- Par transition radiative ($S_1 \rightarrow S_0$) avec émission de photons de fluorescence utilisés pour le PD ;
- Par transition non radiative à un état intermédiaire, l'état excité triplet utilisé pour la PDT.

En effet, il est possible que le PS par conversion intersystème puisse rejoindre un état excité triplet de plus faible énergie ($^3P^*$ ou T_1), mais d'une durée de vie plus longue, d'environ 10^{-6} à 1 s, lui permettant d'interagir avec les substrats situés dans son environnement proche. Lors d'absence de substrat comme l'oxygène par exemple, le PS peut retourner à son état fondamental par transition radiative ($T_1 \rightarrow S_0$) avec émission de phosphorescence. En revanche, en présence d'oxygène, deux réactions dites de type I ou II peuvent entrer en compétition et conduire à des cascades de réactions oxydatives à l'origine de la destruction des cellules cancéreuses **(Figure 21)** (30).

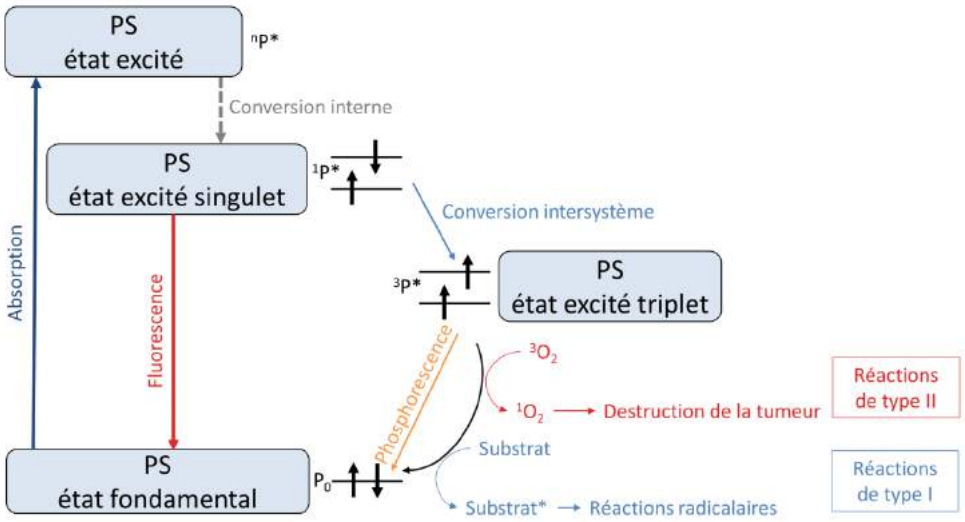


Figure 21 : diagramme de Jablonski

Par absorption de lumière, le PS va passer de son état fondamental (P_0) à son état excité ($^nP^*$) puis, par conversion interne, à un niveau d'excitation singulet de plus faible énergie ($^1P^*$) qui par transition intersystème, peut rejoindre un état triplet ($^3P^*$) qui va conduire à la production d'espèces réactives de l'oxygène. Source : manuscrit de thèse Chloé Fidanzi-Dugas, 2016

II.3.1. Les réactions photochimiques de type I

Les réactions photochimiques de type I consiste en la réaction directe du PS à l'état excité avec des substrats biologiques (S) par transfert d'électrons ou d'atomes d'hydrogène à l'origine de la production d'espèces radicalaires (31).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Les formes oxydées du PS ($P^{\bullet}$) ou du substrat ($S^{\bullet}$) ainsi que leurs formes semi-réduites ($P^{\bullet-}$ et $S^{\bullet-}$) peuvent réagir avec l'oxygène moléculaire environnant et former respectivement des radicaux peroxydes à l'origine d'une chaine d'auto-oxydation et de l'anion superoxyde ($0_2^{\bullet-}$) **(Figure 22)**. Bien que cette espèce ne soit pas particulièrement réactive, elle peut interagir avec d'autres substrats pour former d'autres espèces réactives de l'oxygène (ERO) tels que le radical hydroperoxyle ($HO_2^{\bullet}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$). Les ERO sont de puissants oxydants pour de nombreuses biomolécules induisant ainsi des réactions cytotoxiques. Dans les réactions photochimiques de type I, l'oxygène n'est pas impliqué dans la première étape du mécanisme cependant il influence fortement les réactions chimiques suivantes afin de permettre la production d'ERO.

<u>Etape 1 :</u> $^3P^* + S \rightarrow P^{\bullet+} + S^{\bullet-}$ ou $^3P^* + S \rightarrow P^{\bullet-} + S^{\bullet+}$

<u>Etape 2 :</u> $P^{\bullet-}$ (ou $S^{\bullet-}$) $+ O_2 \rightarrow P$ (ou S) $+ O_2^{\bullet-}$

<u>Etape 3 :</u> $O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow HO_2^{\bullet}$

$HO_2^{\bullet} + O_2^{\bullet-} + H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$

$H_2O_2 + O_2^{\bullet-} \rightarrow {}^{\bullet}OH + OH^- + O_2$

Figure 22 : les réactions photochimiques de type I

Les transferts entre le photosensibilisateur et un substrat peuvent être à l'origine de la formation d'espèces réactives de l'oxygène telles que l'anion superoxyde ($0_2^{\bullet-}$), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($^{\bullet}OH$).

II.3.2. Les réactions photochimiques de type II

Dans les réactions photochimiques de type II, cette fois-ci l'oxygène entre en réaction dès la première étape du processus. En effet, l'excès d'énergie du PS à l'état triplet est transféré directement à l'oxygène moléculaire induisant le retour du PS à son état fondamental stable et surtout à la formation de l'oxygène singulet ($^1O_2$) **(Figure 23)**.

$$^3P^* + O_2 \rightarrow P + {}^1O_2$$

Figure 23 : les réactions photochimiques de type II

L'oxygène singulet est capable d'oxyder de nombreuses biomolécules de la cellule entraînant la dégradation d'un grand nombre de constituants cellulaires et donc par conséquent sa mort. En effet, les triacylglycérols saturés, les phospholipides ou le cholestérol des membranes constituent une part importante des substrats de l'oxygène singulet. De plus, les acides aminés comme notamment le tryptophane, l'histidine et la méthionine ou les acides nucléiques sont très sensibles à l'oxydation **(Figure 24)** (32,33).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

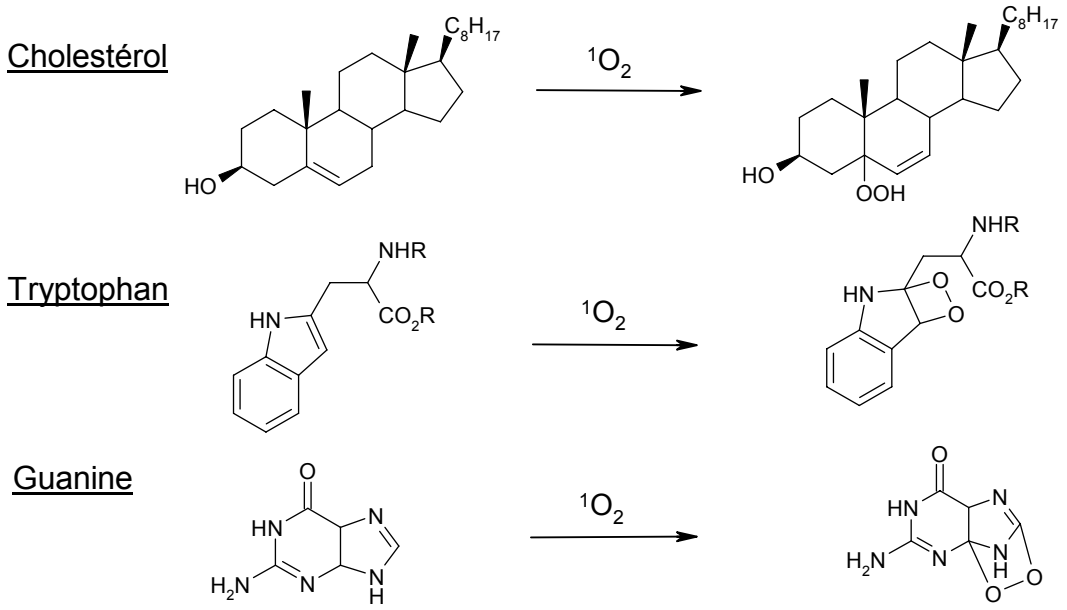


Figure 24 : exemples d'oxydation et de cycloaddition des composants cellulaires menant à la destruction de la tumeur

Source : adapté de Kulig *et al.*, 1973 (32) et Baptista *et al.*, 2017 (33)

L'oxygène singulet a une très forte réactivité mais une durée de vie très courte limitant fortement la zone de réaction puisqu'il parcourt environ 10 nm dans la cellule. Le site intracellulaire de localisation du PS est donc déterminant dans la réponse cellulaire attendue. En effet, le type de mort cellulaire induit par la PDT est dépendant du site de localisation du PS. Un PS présent au niveau des organites cellulaires comme la mitochondrie, le réticulum endoplasmique (RE) ou les lysosomes va préférentiellement induire une mort cellulaire programmée ou apoptose alors qu'un PS situé au niveau membranaire induira plutôt un mécanisme non-apoptotique (34). La compétition entre ces 2 types de réaction est contrôlée notamment par la nature du PS et la concentration en oxygène. On parle de type I et type II uniquement pour les réactions primaires qui découlent de l'excitation du PS. En effet, les ERO formées après les réactions de type I peuvent également se former à la suite de réactions de type II. L'oxygène singulet en réagissant avec les biomolécules cellulaires peut produire des hydroperoxydes qui peuvent être convertis en espèces radicalaires. Parmi ces ERO, l'oxygène singulet possède une très forte réactivité mais une durée de vie très faible limitant sa distance de diffusion dans la cellule. En revanche, d'autres espèces comme l'anion superoxyde ou le peroxyde d'hydrogène possèdent une durée de vie plus longue leur permettant de diffuser à distance dans la cellule et de produire des dommages oxydants plus étendus **(Figure 25)** (35). Cependant, l'oxygène singulet peut également réagir avec le PS en le détruisant par ouverture de ces macrocycles, on parle de photo-blanchiment.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

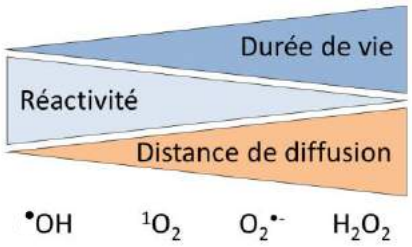


Figure 25 : relation entre la durée de vie, la réactivité et la distance de diffusion des espèces réactives de l'oxygène

II.4. Le photo-blanchiment des photosensibilisateurs

Dans le cadre de la PDT, la majorité des PS utilisés subissent l'action des ERO nouvellement formées. Les PS subissent alors une dégradation progressive diminuant fortement leur capacité à absorber la lumière, on parle de photo-blanchiment. Il existe 2 mécanismes de photo-blanchiment : la photo-dégradation et la photo-transformation. La photo-dégradation consiste en la fragmentation de la structure du PS à l'origine de la formation de plusieurs photo-produits peu ou incapables d'absorber la lumière. Lors de la photo-transformation, la structure du PS reste intacte mais sa capacité à absorber la lumière se modifie par la diminution d'absorbance au niveau de certaines bandes spectrales, la diminution d'intensité de fluorescence ou encore par la formation de nouvelles bandes d'absorption et d'émission. Cette formation de nouvelles bandes présente l'avantage d'induire la formation de nouveaux photo-produits pouvant eux-mêmes servir de PS (36). Le problème majeur du photo-blanchiment dans la PDT à visée anticancéreuse est la diminution de la concentration du PS dans la zone irradiée. Cependant, ce problème peut être exploité par une forte dose de lumière afin de préserver les tissus sains. En effet, puisque le PS est capable de s'accumuler préférentiellement au niveau de la tumeur, le photo-blanchiment sera donc beaucoup plus important dans les zones saines contenant moins de PS alors qu'au niveau tumoral, la quantité plus importante de PS permettra une destruction tissulaire. De plus, ce photo-blanchiment peut être exploité afin de diminuer la photosensibilisation cutanée limitant ainsi les effets secondaires liés à la PDT (37).

Le choix du PS utilisé est d'une importance majeure dans le cadre de la PDT à visée anticancéreuse afin de permettre une photosensibilisation efficace. Le PS doit donc répondre à plusieurs critères :

- Le spectre d'absorption du PS ne doit pas se situer dans la même région spectrale que les composés à oxyder afin d'éviter les réactions secondaires indésirables.
- Le PS ne doit pas réagir avec les composés à oxyder en dehors des réactions photochimiques.
- L'énergie de l'état triplet du PS et sa durée de vie doivent être très importantes afin de permettre la transition de l'excès d'énergie à l'oxygène et la formation de l'oxygène singulet.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

- Le rendement quantique de la conversion intersystème doit être le plus grand possible pour permettre une quantité suffisante d'état triplet conduisant à une forte production d'ERO.

II.5. Les photosensibilisateurs

Les PS généralement utilisés comme anticancéreux peuvent être classés en 2 catégories : les dérivés non tétrapyrroliques et les PS tétrapyrroliques (38). Ces derniers peuvent eux-mêmes être classifiés en 3 sous-catégories : les PS de première génération qui correspondent aux molécules naturelles, de deuxième génération qui sont les molécules de synthèse et les PS de troisième génération correspondant aux PS vectorisés.

II.5.1. Les PS non tétrapyrroliques

Bien qu'ils soient beaucoup moins étudiés que les PS tétrapyrroliques, les PS non tétrapyrroliques représentent une autre approche pour la PDT. Il existe un nombre important de PS non tétrapyrroliques mais les 2 principaux utilisés en PDT sont l'hypéricine et un dérivé de la phénothiazine, le bleu de méthylène.

L'hypéricine

La découverte et la caractérisation de l'hypéricine a été réalisée lors des investigations menées pour comprendre les causes de l'hypéricisme. Il s'agit d'une photosensibilité cutanée des bovins après l'ingestion de grandes quantités de plantes *Hypericium perforatum*. L'hypéricine est une quinone possédant un pic maximum d'absorbance à 590 nm **(Figure 26)**.

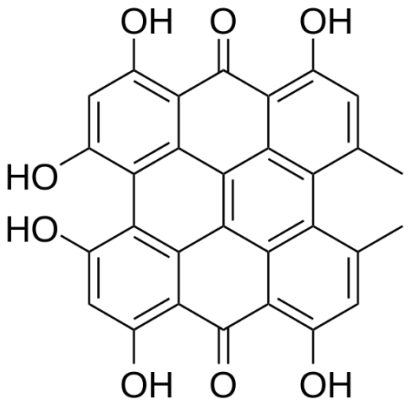


Figure 26 : structure de l'hypéricine

L'hypéricine semble être un bon PS pour la PDT de par sa sélectivité tumorale, sa demi-vie d'environ 38h limitant sa phototoxicité résiduelle, son accumulation tumorale rapide d'environ 2 à 4h après administration et sa forte capacité à produire de l'oxygène singulet (39).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Cependant, la PDT utilisant l'hypéricine comme PS est fortement dépendante de l'oxygène puisqu'en condition hypoxique le fort rendement en oxygène singulet de l'hypéricine n'est plus présent conduisant à une phototoxicité nulle. De plus, la nature lipophilique de l'hypéricine est responsable de sa localisation membranaire limitant ses effets cytotoxiques. Plusieurs études *in vitro* et *in vivo* ont démontré les effets anticancéreux de l'hypéricine en PDT (40). Malgré des effets anticancéreux prometteurs, seules quelques études cliniques de phase I ont été lancées démontrant le faible intérêt de la recherche actuelle pour ce PS.

Le bleu de méthylène

Le bleu de méthylène est un dérivé de la phénothiazine découvert à la fin du XIXème siècle **(Figure 27)**. Le bleu de méthylène semble également être un bon PS pour la PDT puisqu'il possède un pic d'absorbance maximum à 664 nm et a un bon rendement quantique de formation d'oxygène singulet. De plus, il a l'avantage de s'incorporer au niveau des organelles cellulaires et notamment la mitochondrie qui joue un rôle essentiel dans la mort cellulaire par apoptose (41). Plusieurs études *in vitro*, *in vivo* et même cliniques ont montré l'efficacité anticancéreuse du bleu de méthylène en PDT (42). Cependant, le bleu de méthylène est très rapidement dégradé par des enzymes et il ne possède un ciblage tumoral que pour certains tissus limitant fortement son utilisation clinique.

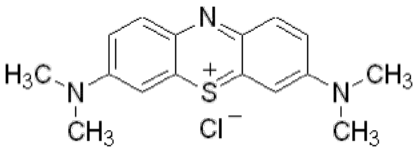


Figure 27 : structure du bleu de méthylène

II.5.2. Les PS tétrapyrroliques

II.5.2.1. Les PS de première génération

Les premiers PS tétrapyrroliques utilisés en PDT sont obtenus à partir de l'hémoglobine. Le traitement chimique de l'hémoglobine par un acide minéral produit 2 fractions : la globine et l'hème avec un fer ferreux. L'oxydation de l'hème transforme le fer ferreux en son état ferrique produisant l'hématine. L'élimination du fer par un acide permet la production de la porphyrine de l'hémoglobine appelée protoporphyrine. La fixation de molécules d'eau sur les doubles liaisons vinyliques conduit à l'hématoporphyrine (Hp). A la fin des années 50, Schwartz obtient des dérivés d'hématoporphyrine (HpD) par acétylation acide avec un mélange d'acides sulfurique et acétique puis d'une alcalinisation avec une solution d'acétate de sodium (43). Dans les années suivantes, Lipson a démontré l'efficacité des HpD dans la détection et le suivi des cancers ainsi que dans le traitement anticancéreux au niveau du cancer du sein (44,45). Par la suite, de nombreux essais cliniques furent lancés afin de démontrer l'effet anticancéreux des HpD.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Cependant, ce n'est que dans les années 80 que Dougherty par une chromatographie liquide haute performance a démontré que les HpD étaient en fait un mélange complexe de diverses porphyrines (46) :

- 20% d'hématoporphyrine (Hp) ;
- 20 à 30% d'hydroxyéthylvinyldeutéroporphyrine (HvD) ;
- 3 à 5% de protoporphyrine IX (PpIX) ;
- 50% d'une fraction plus hydrophobe constituée de deux hématoporphyrine-éther liées en 2 ou en 4 par leur groupement hydroxyéthylvinyl et appelées dihématoporphyrine éther (DHE).

Par la suite Dougherty a mis au point par ultrafiltrat de l'HpD, le Photofrin®. Le porfimère sodique ou Photofrin® est en fait une fraction enrichie en composés les plus actifs de l'HpD **(Figure 28)**.

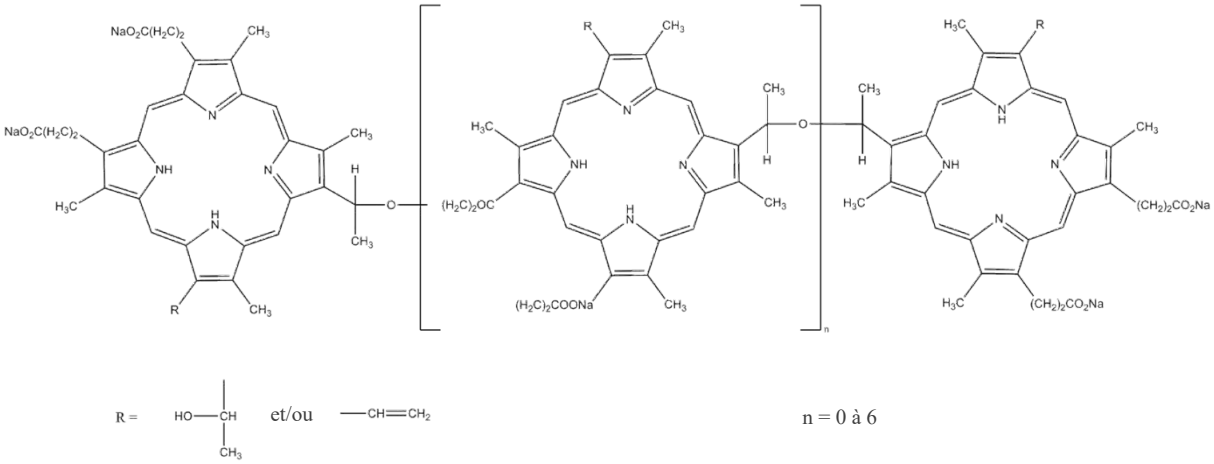


Figure 28 : structure du Photofrin®

Actuellement le Photofrin® est utilisé en clinique pour le traitement du psoriasis et des maladies de la peau ainsi que certains types de cancers. En effet, le Photofrin® est le premier PS autorisé en clinique depuis 1993 au Canada pour le traitement des cancers de la vessie (47). La majorité des patients atteints d'un cancer de la vessie présentent des tumeurs superficielles, candidates idéales pour de la PDT. Une étude menée chez 58 patients atteints d'un carcinome superficiel a montré une réponse thérapeutique positive dans environ 80% des cas après ablation et traitement par PDT avec le Photofrin® (48). Après plus de 4 ans de suivi, 31 patients ne présentaient plus aucun signe de cancer. Depuis 1995, il est autorisé par la Food and Drug Administration (FDA) aux États-Unis dans le traitement du cancer de l'œsophage puis en 1998 pour le traitement des cancers du poumon non à petites cellules. Une étude menée sur 11 patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules inopérable de stade I a montré, par un traitement PDT utilisant le Photofrin®, une rémission complète chez 10 patients et une rémission partielle chez le 11ème (49).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Dans cette même étude menée sur 15 patients atteints d'un cancer plus avancé de stade III, une rémission partielle dans plus de 70% des cas a été observée. En France, le Photofrin® n'est autorisé que dans le traitement des rechutes des cancers bronchiques non à petites cellules ou du cancer de l'œsophage ayant fait l'objet d'un traitement locorégional antérieur.

Malgré les autorisations cliniques des PS de première génération comme le Photofrin®, ils présentent de nombreux inconvénients. Le Photofrin® est constitué d'un mélange complexe d'environ 60 molécules différentes dont la composition d'un lot à l'autre est peu reproductible et il ne possède qu'une faible absorption dans le rouge, 10 à 20 fois inférieure à son pic d'absorption très intense dans le bleu, limitant son efficacité envers les tumeurs profondes. De plus, le Photofrin® souffre d'une faible sélectivité pour les cellules tumorales puisqu'il se concentre également dans les tissus sains riches en composants réticulo-endothéliaux. Enfin, la clairance du Photofrin® est très lente surtout au niveau de la peau induisant une photosensibilité cutanée pouvant durer jusqu'à 6 semaines. C'est pourquoi dans les années 80, les caractéristiques d'un bon PS ont été mises en évidence :

- Le PS doit être d'une structure chimique définie et constante, facilement synthétisable en termes de coût et de reproductibilité.
- Le PS doit être non cytotoxique à l'obscurité.
- Le PS doit se concentrer préférentiellement dans les cellules tumorales et avoir une clairance rapide pour ne pas générer de photosensibilité après le traitement.
- Le PS doit posséder un rendement quantique en état triplé élevé et il ne doit pas s'agréger dans le milieu cellulaire permettant une forte production en oxygène singulet.
- Le PS doit être stable dans le milieu cellulaire, notamment vis-à-vis des enzymes circulantes, lui permettant d'atteindre les cellules tumorales avant sa dégradation.
- Le PS doit posséder une forte absorption dans la lumière rouge afin que l'effet thérapeutique de la PDT soit le plus profond possible.

II.5.2.2. Les PS de deuxième génération

La seconde génération de PS a été développée grâce à différentes modifications chimiques apportées à la structure des composés tétrapyrroliques. La majorité de ces composés sont d'origine synthétique mais ils peuvent être synthétisés à partir de substances naturelles. Les PS de deuxième génération possèdent un spectre d'absorption de la lumière optimisé dans le rouge afin de permettre le traitement de tumeurs plus importantes ou plus profondes. De plus, ce sont des composés purs avec un meilleur rendement quantique en oxygène singulet augmentant l'effet anticancéreux de la PDT et une clairance bien plus importante que les PS de première génération limitant grandement la phototoxicité retrouvée avec les anciens PS en clinique (50).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Le Foscan®

La *méso*-tétrahydroxyphénylchlorine (*m*-THPC) ou témoporphyne est une chlorine issue de la réduction d'une double liaison de la porphyrine correspondante. Cette molécule est commercialisée par la société Allemande Biolitec Pharma sous le nom de Foscan® **(Figure 29)**.

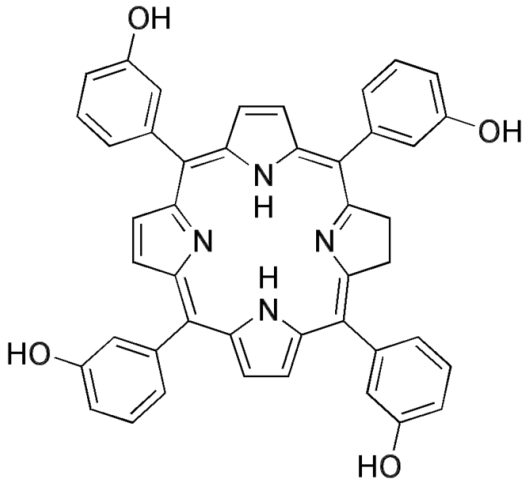


Figure 29 : structure du Foscan®

Le Foscan® a été approuvé en 2001 par l'agence européenne des médicaments (AEM) pour le traitement palliatif des carcinomes épidermoïdes avancés de la tête et du cou après échec des traitements antérieurs et chez les patients qui ne peuvent pas être traités par radiothérapie, chirurgie ou chimiothérapie systémique. En revanche, le Foscan® a été refusé par la FDA aux États-Unis. De nombreuses études cliniques ont démontré la forte efficacité du Foscan® pour le traitement des cancers de la tête et du cou (51). En effet, une étude portant sur 25 patients atteints de ce type de cancer à des stades précoces avec au total 33 tumeurs traitées par PDT avec le Foscan® a montré une réponse complète de 85% (52). Ce fort taux de réponse est également retrouvé chez les patients atteints d'un cancer de la cavité orale aux stades précoces avec une réponse complète de 89% (53). Cependant, ce taux de réponse chute drastiquement si la tumeur fait plus de 3 cm puisque, dans ce cas, la réponse complète n'est plus que de 29%. Le Foscan® possède d'autres indications cliniques potentielles puisqu'il a démontré son efficacité dans les cancers du sein (54), du pancréas (55) et de la prostate (56).

Le Foscan® semble répondre à la majorité des qualités idéales d'un PS. En effet, il est d'une grande pureté proche de 100% et s'accumule préférentiellement dans les tissus tumoraux. De plus, il présente un fort coefficient d'absorption dans le rouge par la présence d'une bande principale à 652 nm. Il présente également une 2ème bande principale à 415 nm lui permettant une utilité en PD. Le Foscan® présente également une photocytotoxicité élevée. En effet, c'est l'un des PS qui a actuellement démontré le plus fort rendement quantique en oxygène singulet lui permettant d'induire des effets anticancéreux à des doses ou à des fluences beaucoup plus faibles que d'autres PS notamment porphyriques. Cependant, même si le Foscan® possède une sensibilité cutanée induite moins importante que le Photofrin®, environ 2 à 4 semaines, sa clairance est lente induisant de nombreux effets secondaires lors de son utilisation en clinique.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Le Lutrin®

La texaphyrine de lutétium ou Lu-Tex est développée par la société Américaine Pharmacyclics sous le nom de Lutrin® **(Figure 30)**. Le Lutrin® présente 2 avantages majeurs par rapport aux autres PS : il présente un pic d'absorption à 732 nm lui permettant une meilleure pénétration au sein des tissus diminuant également l'absorption de la lumière par l'hémoglobine ; de plus, il présente une demi-vie courte dans le plasma, environ 7 h, lui permettant de diminuer fortement la photosensibilité cutanée résiduelle en comparaison au Photofrin® ou au Foscan®.

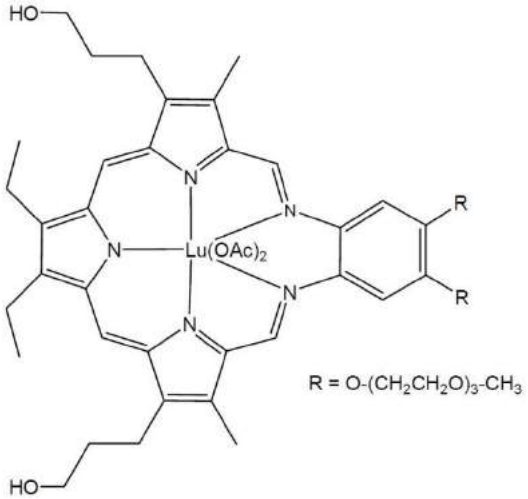


Figure 30 : structure du Lutrin®

Le Lutrin® n'est pas encore approuvé en clinique et il a même été refusé par la FDA aux États-Unis. Néanmoins, il a été utilisé lors d'essais cliniques de phase I en 1998 sur 16 patients atteints de cancers du sein récurrents (57) et en 2008 sur 17 patients atteints d'adénocarcinomes prostatiques récurrents (58). Malgré des effets anticancéreux prometteurs, le traitement reste encore en phase d'optimisation.

Le Tookad®

La bactériochlorophylle de palladium fait partie des PS à demi-vie très courte avec une clairance inférieure à 1 h et avec une absorption maximale à 760 nm. Elle est commercialisée par la société Luxembourgeoise Steba Biotech sous le nom de Tookad® ou WST09 ou dans sa forme soluble Tookad® soluble ou WST11 **(Figure 31)**.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

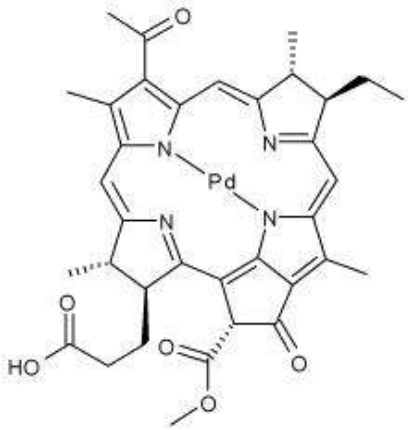


Figure 31 : structure du Tookad®

Le Tookad® a la particularité, du fait de sa demi-vie très courte, d'être activé au niveau intravasculaire et non plus au niveau tumoral. On parle alors de thérapie photodynamique ciblée à visée vasculaire (VTP) qui a pour but d'induire une destruction de la néovascularisation par des phénomènes de vasoconstriction et de lyse endothéliale conduisant à l'ischémie tumorale **(Figure 32)**. Le Tookad® a l'avantage de ne pas induire de phototoxicité cutanée de par sa faible distribution dans les tissus et de pouvoir être utilisé en complément d'autres thérapies conventionnelles.

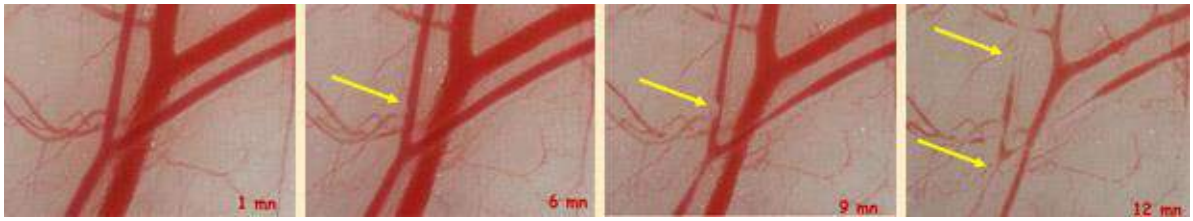


Figure 32 : mécanisme d'action du Tookad®
Par phénomène de vasoconstriction et lyse endothéliale, le Tookad® permet la destruction de la néovascularisation tumorale.
Source : Steba Biotech

Les résultats très encourageants de 2 études cliniques ont permis au Tookad® d'être approuvé au Mexique et par la communauté européenne et est en cours d'analyse par la FDA pour le traitement des cancers prostatiques. En effet, une étude clinique de phase III en Amérique latine sur 81 patients a démontré une efficacité anticancéreuse importante puisque 74% des patients traités par VTP avec le Tookad® avaient des biopsies négatives après 12 mois de traitement et avec une diminution importante d'effets secondaires comme la perte de la fonction érectile ou l'incontinence urinaire en comparaison des traitements conventionnels (59). La seconde étude de phase III réalisée en Europe et principalement en France a démontré l'efficacité de la VTP avec le Tookad® en comparant 206 patients traités avec le Tookad® contre 207 patients non traités avec le Tookad®. Après 24 mois, 49% des patients traités au Tookad® avaient une biopsie négative contre seulement 14% dans le groupe non traité démontrant l'intérêt majeur de ce PS (60).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Le Laserphyrin®

La mono-L-aspartyl chlorine 6 (Npe6) ou talaporfin est une chlorine dérivée de la chlorophylle A, hydrophile grâce à son résidu aspartyl. La Npe6 est commercialisée par la société Japonaise Nippon Petrochemicals sous le nom de Laserphyrin® **(Figure 33)**.

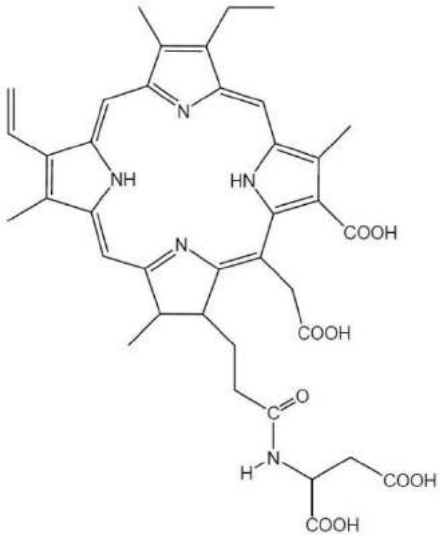


Figure 33 : structure du Laserphyrin®

La Npe6 présente un maximum d'absorption à 664 nm et une demi-vie courte puisque l'irradiation doit être réalisée dans les 4 h après l'administration du PS. Le Laserphyrin® est autorisé au Japon depuis 2004 pour le traitement des cancers pulmonaires localisés. Une étude clinique de phase II sur 41 patients atteints de cancers pulmonaires précoces et superficiels a montré une réponse complète de 83% après traitement par PDT avec la Npe6 (61). Cependant, le Laserphyrin® a également démontré son efficacité dans d'autres types de cancers comme dans les cancers de l'œsophage résistants aux radio-chimiothérapies dans une étude clinique de phase II démontrant une réponse complète de 88% sur 26 patients sans phototoxicité résiduelle due à la Npe6 (62). C'est également le cas pour le traitement des métastases pulmonaires du CCR (63).

Le Levulan®

Le 5-ALA est un précurseur porphyrinique impliqué dans la biosynthèse de l'hème. Le 5-ALA peut être métabolisé au niveau de la mitochondrie en PpIX qui servira de PS pour la PDT **(Figure 34)**.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

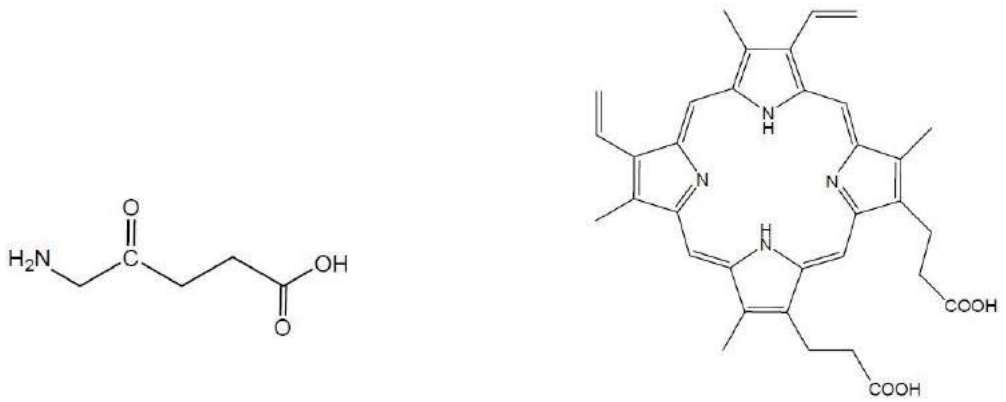


Figure 34 : structure de l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) et de la protoporphyrine IX (PpIX)

En effet, la biosynthèse de l'hème est finement contrôlée dans la cellule évitant que la concentration en PpIX physiologique n'atteigne jamais le seuil requis de photosensibilisation. Il existe un rétrocontrôle agissant sur l'ALA-synthétase qui bloque la néoformation de 5-ALA. Néanmoins, ce processus peut être contourné par l'administration exogène de 5-ALA en concentration importante. La conversion du 5-ALA en PpIX sera rapide mais en revanche la ferrochélatase sera dans l'incapacité de convertir aussi rapidement la PpIX en hème, induisant de façon transitoire des concentrations élevées de PpIX dans la cellule **(Figure 35)** (64).

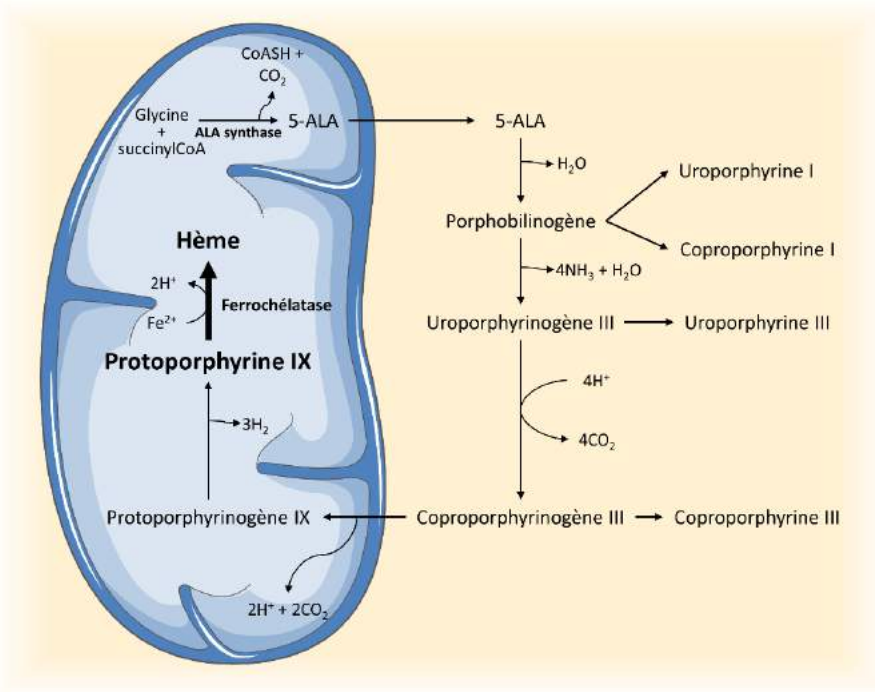


Figure 35 : biosynthèse de l'hème

Source : manuscrit de thèse Chloé Fidanzi-Dugas, 2016

Licence CC BY-NC-ND 3.0

La PpIX contrairement aux autres PS de 2ème génération ne possède pas de pic d'absorption majoritaire dans le rouge puisque son maximum d'absorption se trouve à 410 nm. Cependant, une irradiation en lumière rouge est possible du fait de la présence d'un plus petit pic à 635 nm. Elle présente néanmoins plusieurs avantages comme notamment la possibilité de l'administrer par voie topique sur des lésions superficielles. En effet, une application topique de 5-ALA conduit à une accumulation de PpIX majoritairement dans les cellules cancéreuses du fait de la diminution de l'activité de la ferrochélatase (65) et des faibles concentrations en fer (66) limitant le taux de conversion de la PpIX en hème en comparaison des cellules saines. C'est également le cas au niveau des lésions néoplasiques du fait de la perméabilité vasculaire des tissus tumoraux. De plus, un court intervalle de temps est requis afin d'obtenir une accumulation maximale de PpIX intracellulaire, entre 1 et 8 h selon le mode d'administration, en comparaison du Foscan® par exemple qui nécessite plus de 4 j. La clairance de la PpIX est également assez rapide, environ 24 à 48 h. Le 5-ALA est commercialisé sous le nom de Levulan® et a été approuvé en 2000 dans le traitement topique de kératoses actiniques du visage et du cuir chevelu mais également pour le traitement des cancers de la peau non-mélaniques.

Le Levulan® est aujourd'hui utilisé en routine dans les services de dermatologie puisqu'une étude a démontré une efficacité similaire d'un unique traitement par PDT au traitement conventionnel par le 5-FU des kératoses actiniques des mains se déroulant 2 fois/j pendant 3 semaines (67). Cependant, malgré le développement de dérivés du Levulan® comme le Metvix® possédant une pénétration plus importante, ces traitements restent préconisés uniquement pour les tumeurs superficielles.

II.5.2.3. Les PS de troisième génération

Les PS de troisième génération sont actuellement en voie de développement. Afin d'améliorer la sélectivité tumorale des PS de deuxième génération, ces nouveaux PS sont substitués par des motifs chimiques qui peuvent être spécifiquement reconnus par les cellules tumorales. Ces motifs sont généralement des biomolécules : des stéroïdes, des sucres, des amines, des vitamines ou des anticorps. En effet, les cellules tumorales possèdent à leur surface des antigènes spécifiques non retrouvés au niveau des cellules saines permettant l'utilisation d'anticorps dirigés. Cependant, il ne faut pas omettre qu'une tumeur est un ensemble cellulaire hétérogène avec des types cellulaires possiblement insensibles à cette technologie entrainant des récidives et renforçant l'intérêt des polythérapies. Néanmoins, cette technologie reste prometteuse et s'apparente au cheval de Troie de la mythologie grecque. En effet, ces substitutions chimiques reconnues spécifiquement par les cellules cancéreuses servent de vecteurs aux PS limitant fortement l'effet cytotoxique sur les cellules saines et décuplant l'effet anticancéreux sur les cellules cancéreuses.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Les PS couplés aux stéroïdes sexuels

Il est connu que certains cancers sont sensibles aux hormones. En effet, dans les cancers du sein et des ovaires, les cellules tumorales surexpriment le récepteur aux œstrogènes. Il a été démontré que la liaison de l'estradiol sur la tétraphénylporphyrine (TPP) augmente fortement le ciblage de cellules humaines de cancer du sein en comparaison de la TPP seule **(Figure 36)** (68). La TPP est une porphyrine connue pour avoir un bon rendement quantique en oxygène singulet mais son hydrophobicité limite son utilisation en clinique.

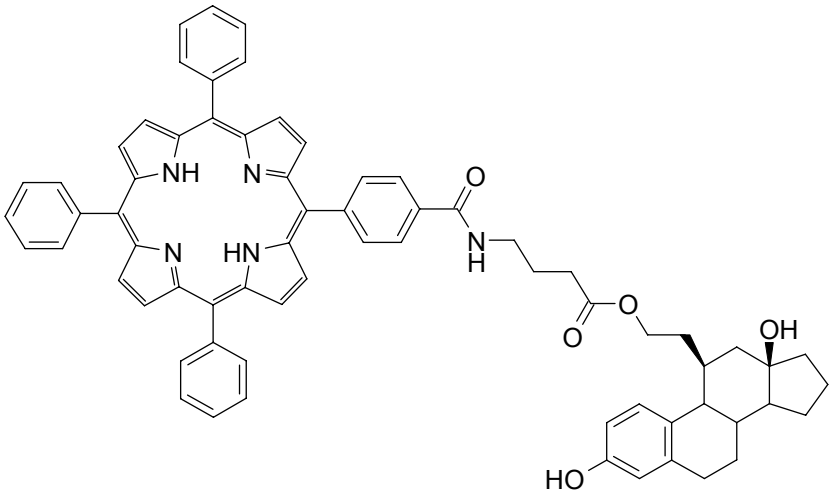


Figure 36 : structure du complexe estradiol-tétraphénylporphyrine (TPP)

Les PS couplés aux acides foliques

Il est connu que les récepteurs aux acides foliques sont surexprimés à la surface de nombreuses cellules cancéreuses comme pour les cancers du poumon ou des ovaires. En effet, il a été montré que ces récepteurs sont surexprimés de 10 à 100 fois plus dans les cellules cancéreuses ovariennes par rapport aux cellules normales (69). L'association de la 4-carboxyphénylporphyrine, un dérivé de la TPP, avec l'acide folique a permis de démontrer l'efficacité de ce ciblage tumoral sur des cellules cancéreuses surexprimant le récepteur aux folates **(Figure 37)** (70). En effet, cette molécule possède un ciblage tumoral 7 fois supérieur au PS seul augmentant par conséquent son action phototoxique à des doses similaires.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

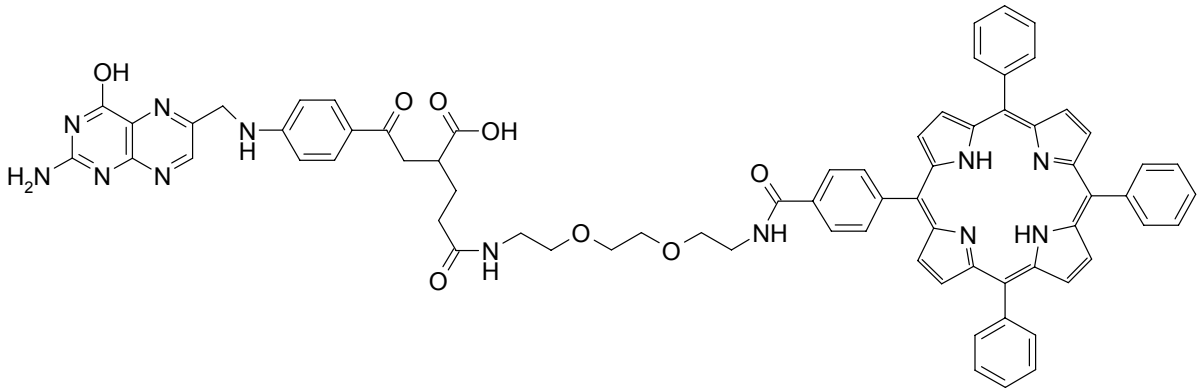


Figure 37 : structure du complexe acide folique-4-carboxyphénylporphyrine

Les PS polyaminés

Les cellules cancéreuses de par leur division cellulaire plus importante que les cellules saines nécessitent plus de polyamines. En effet, les polyamines jouent un rôle important dans la croissance cellulaire leur permettant une utilisation vectorielle grâce à leur métabolisation anormalement élevée du fait de l'activité mitotique intense des cellules cancéreuses. Il a été démontré une augmentation de 35 fois l'efficacité anticancéreuse du chlorambucil lorsqu'il est conjugué avec la spermidine par rapport à son utilisation seule (71). Récemment en PDT, une étude *in vivo* a montré une plus forte efficacité anticancéreuse du couplage PpIX-dispermidine par rapport à la PpIX seule par une augmentation de l'incorporation dans des cellules humaines de cancer de la prostate **(Figure 38)** (72).

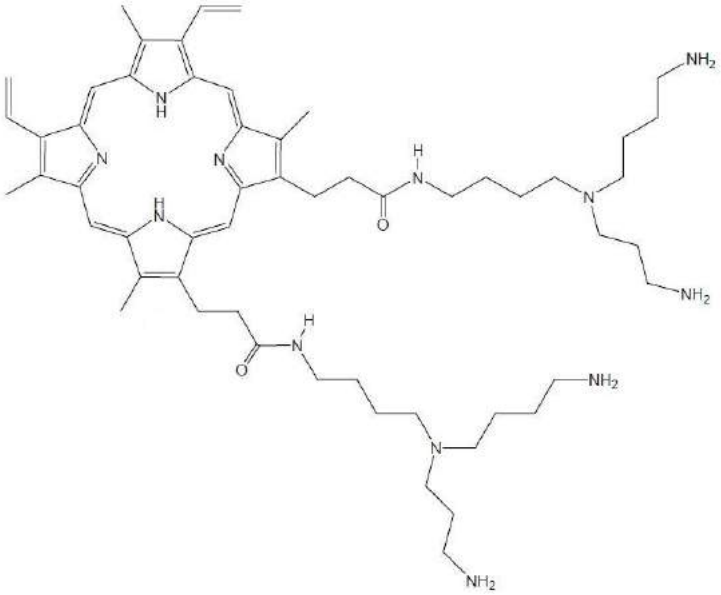


Figure 38 : structure de de la protoporphyrine IX dispermidinée

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Les PS glycoconjugués

Les PS glycosylés ont pour but d'être reconnus par les récepteurs des lectines capables de reconnaître spécifiquement les résidus glycosidiques. En effet, ces récepteurs transmembranaires sont surexprimés par certaines cellules cancéreuses. Il a été montré sur des cellules humaines de CCR l'augmentation de l'efficacité anticancéreuse de la TPP substituée par 3 groupements mannose **(Figure 39)** (73).

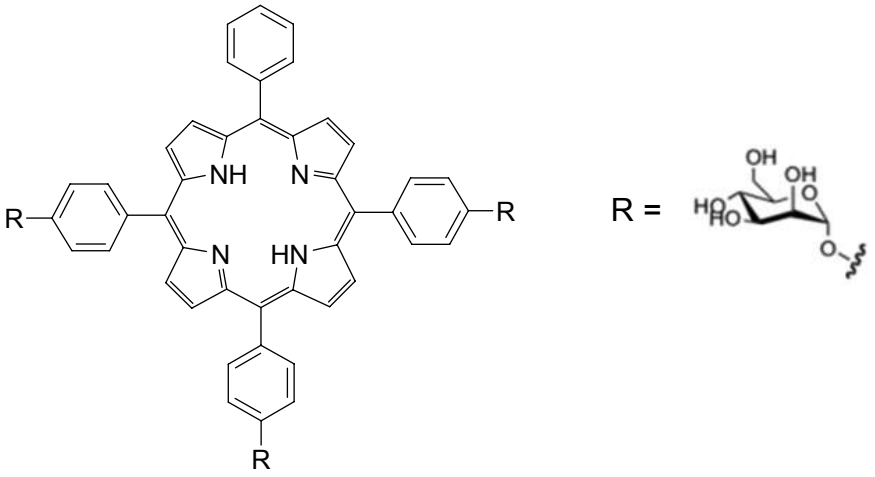


Figure 39 : structure de la tétraphénylporphyrine substituée par 3 groupements mannose

Les PS à motifs peptidiques

Ces PS ont pour but de cibler les récepteurs des $\alpha_v\beta_3$ intégrines qui sont surexprimés à la surface des cellules cancéreuses. Ils sont couplés à un peptide RGD (Arg-Gly-Asp) cyclisé afin de diminuer leur hydrolyse par les peptidases. Une étude *in vivo* a montré une accumulation tumorale de plus de 10 fois supérieure de la PpIX-RGD en comparaison à la PpIX seule **(Figure 40)** (74).

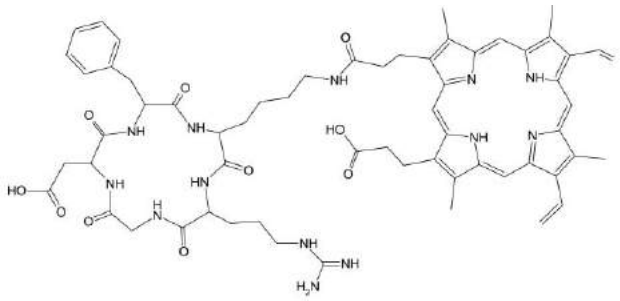


Figure 40 : structure de la protoporphyrine IX substituée par un peptide RGD

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Les PS couplés aux anticorps monoclonaux

Les récepteurs à activité tyrosine kinase comme l'EGFR ou le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) s'activent lors de la fixation de leurs ligands. Ces récepteurs sont souvent surexprimés dans de nombreux cas de cancers comme notamment les cancers pulmonaires pour l'EGFR et les cancers du sein pour l'HER2 (sauf pour la catégorie la plus rare mais la plus agressive des cancers mammaires, le cancer du sein triple négatif). La conjugaison de PS à des anticorps monoclonaux spécifiques de ces récepteurs va permettre un ciblage préférentiel des cellules cancéreuses. En effet, il a été montré sur des études *in vivo* que la fixation du cétuximab sur une phthalocyanine (75) et du trastuzumab sur la Npe6 (76) augmentait fortement le ciblage tumoral ainsi que l'efficacité anticancéreuse en comparaison des PS seuls.

II.6. La thérapie photodynamique dans le traitement du cancer colorectal

Le CCR, contrairement au mélanome de la peau, est beaucoup moins accessible en terme d'illumination pour un traitement par PDT mais représente quand même un bon candidat. En effet, le CCR est une tumeur solide généralement localisée et son accessibilité pour un traitement par PDT peut être réalisée assez simplement par coloscopie.

La première utilisation clinique de la PDT pour le CCR remonte à 1986 lorsque le chirurgien mexicain, Lemuel Herrera-Ornelas, utilise des HpD sur 14 patients atteints de CCR non résécables ou en rechute (77). Le protocole consistait en l'administration intraveineuse de 3 mg/kg d'HpD ou 2 mg/kg de Photofrin® suivi d'une irradiation laser à 630 nm à une fluence de 100 à 400 J/cm^2 selon la surface à traiter. Cette étude a permis de démontrer l'efficacité de la PDT en clinique puisque les biopsies de certains patients ne contenaient plus aucune cellule cancéreuse. De plus, cette étude a surtout mis en évidence le fait que la PDT est un protocole diminuant fortement les effets secondaires par rapport aux traitements conventionnels notamment au niveau de la douleur, et que la répétition de la PDT peut être utilisée sans risque.

Depuis cette première étude, plus d'une 20^{aine} d'études cliniques ont été réalisées ou sont en cours avec différents objectifs relatifs à la PDT. Les études cliniques cherchent principalement à démontrer l'efficacité de la PDT même envers les stades avancés de CCR (78–80) ou la faisabilité de la PDT pour le traitement des CCR par coloscopie (81), à optimiser le PS utilisé (82–85), la dose administrée de PS (86), le protocole d'irradiation (87,88) ou encore la possibilité de traiter les métastases notamment hépatiques des CCR par PDT (89) en induisant à chaque fois de très faibles effets indésirables.

Récemment fin 2013, une étude clinique de phase II/III a été lancée en Chine sur des patients atteints de CCR avancés (90). L'objectif de cette étude est de montrer l'intérêt de la PDT puisqu'elle repose sur la comparaison d'un groupe de patients traités avec un protocole de chimiothérapie conventionnelle de type FOLFOX par rapport à un groupe de patients traités avec le même protocole et recevant en plus une PDT par coloscopie.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Le protocole de PDT consiste en l'administration intraveineuse de Photofrin® à 2 mg/kg puis d'une irradiation à 633 nm grâce à un dispositif coloscopique 48 h post-injection. Malheureusement, cette étude est suspendue actuellement.

À ce jour, l'étude clinique clôturée la plus avancée en PDT pour le traitement des cancers de la fin du tube digestif est une étude de phase II/III sur 8 patients atteints de cancer anal, 6 patients présentant un cancer chimio-radio résistant et 2 patients ayant refusé les traitements conventionnels (91). Le protocole consistait en l'injection intraveineuse du Photofrin® comme PS à une concentration de 1,2 mg/kg et, 48 h après injection, par l'irradiation avec une lumière rouge de 630 nm à une fluence de 200 J/cm^2 grâce à un dispositif intra-rectal **(Figure 41)**. Aucun effet indésirable n'a été mis en évidence lors de ce protocole de PDT mise à part une légère douleur passagère au niveau anal chez certains patients. 18 à 48 mois après la PDT, aucun patient n'a rechuté, développé de problème de cicatrisation ou de dysfonctionnement du transit digestif renforçant l'intérêt grandissant de cette nouvelle stratégie thérapeutique tant pour le confort des patients que pour l'efficacité contre les cancers résistants aux traitements conventionnels.

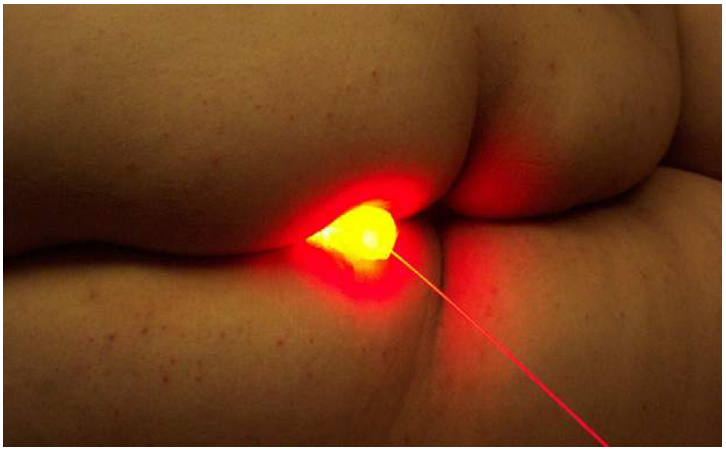


Figure 41 : dispositif intra-rectal au moment de la PDT

Source : Allison *et al.*, 2010 (91)

Malgré les avancées majeures des nombreuses études réalisées, la question du mauvais ciblage tumoral par les PS reste un point essentiel sur lequel la recherche doit s'orienter. En effet, ce mauvais ciblage tumoral a été démontré par l'étude clinique de phase II publiée en 2006 par l'équipe de Stephen Hahn qui consistait à étudier l'incorporation cellulaire du Photofrin® dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains (92). Après injection intraveineuse de Photofrin® à 2,5 mg/kg, 301 échantillons ont été collectés sur 58 patients dont 20 étaient atteints de CCR puis la quantité de Photofrin® a été déterminée dans chaque échantillon. Cette étude a mis en évidence qu'il n'y avait qu'une très faible différence d'incorporation cellulaire du Photofrin® entre les tissus tumoraux et les tissus sains renforçant l'intérêt de l'optimisation du ciblage tumoral des futurs PS.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Actuellement des études précliniques sont en cours afin de permettre d'augmenter l'efficacité anticancéreuse des PS existants par un meilleur ciblage tumoral par exemple, mais également pour permettre la découverte de nouveaux PS plus efficaces, ou encore d'optimiser l'irradiation lumineuse en termes d'énergie, de temps ou de dispositifs d'irradiation (93). Cependant, malgré des résultats très prometteurs dans certaines études, la PDT n'étant pas encore une méthode approuvée pour le traitement des CCR, les études cliniques peinent à s'initier. Au vu des résultats prometteurs des précédentes études cliniques, que ce soit au niveau des tumeurs peu avancées ou de la thérapie palliative pour des lésions de hauts grades, la PDT reste néanmoins sans aucun doute un grand espoir pour un grand nombre de patients (94). La PDT, et notamment par l'utilisation de PS non toxique, permet des traitements répétés sans induire d'effets secondaires graves contrairement à la chimiothérapie. De plus, elle permet des interventions palliatives peu invasives pouvant prolonger la durée de vie des patients mais aussi améliorer leur confort en comparaison des traitements conventionnels actuels.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Chapitre III. Les nanoparticules

III.1. Les nanoparticules

III.1.1. Historique des nanoparticules

Le concept de délivrance contrôlée d'un médicament a été émis au début du XXème siècle par le médecin allemand Paul Ehrlich, considéré comme le père de la chimiothérapie. En effet, Paul Ehrlich cherchait une « magic bullet » permettant d'augmenter l'efficacité du traitement tout en réduisant les nombreux effets secondaires sur l'organisme des chimiothérapies anticancéreuses utilisées à cette époque (95). Malgré les nombreux progrès scientifiques en matière de traitements anticancéreux, ce n'est qu'au début des années 1970 que ce concept fit un grand bond. Sous l'impulsion du Pr. suisse Peter Speiser à l'ETH Zürich avec notamment l'aide du Pr. français Patrick Couvreur, la nanomédecine par l'utilisation de nanoparticules a vu le jour (96). Les nanoparticules se situent à l'interface de trois grandes disciplines : la biologie, la physique et la chimie. Les nanoparticules sont de toutes petites particules de quelques nanomètres à une centaine de nanomètres, de taille bien inférieure à une cellule **(Figure 42)**. Les nanoparticules comprises entre 100 et 1000 nm, bien que de taille nanométrique, sont désignées comme submicrométriques.

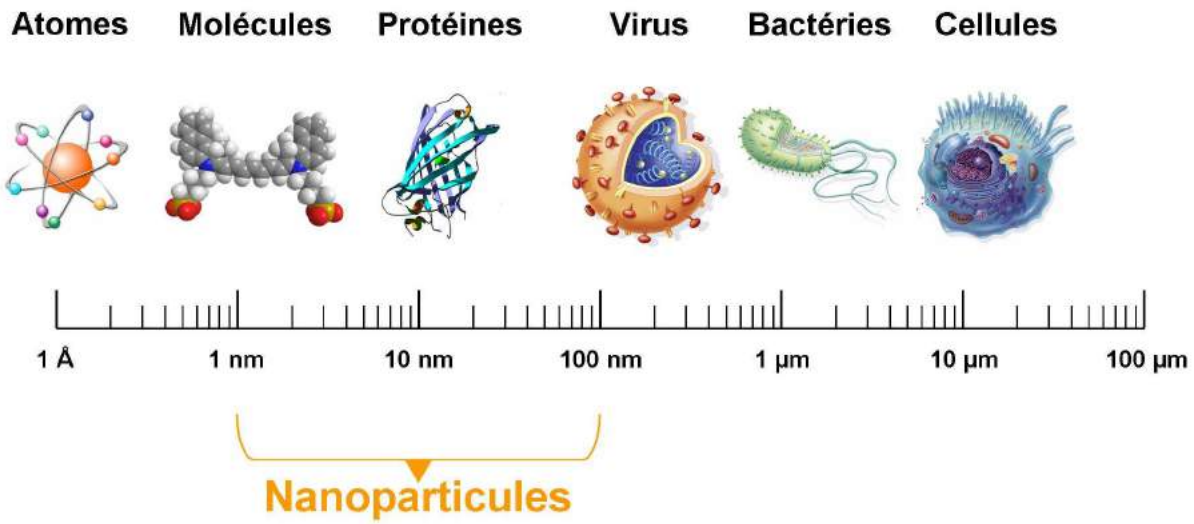


Figure 42 : taille des nanoparticules comparée aux principales structures chimiques et biologiques

Source : manuscrit de thèse Mathieu Goutayer, 2008

III.1.2. Intérêts des nanoparticules

L'administration d'un médicament dans l'organisme rencontre plusieurs barrières naturelles qui peuvent limiter son efficacité. En effet, de nombreuses molécules thérapeutiques peinent à traverser les membranes cellulaires du fait d'un poids moléculaire trop important ou parce qu'elles sont trop hydrophiles posant évidemment des problèmes lorsque la cible de ces molécules est intracellulaire.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

La biodistribution des molécules thérapeutiques a été optimisée par l'avènement des biotechnologies grâce aux vectorisations par des peptides, des sucres, des fragments d'ADN... Cependant, ces molécules sont très instables dans les milieux biologiques à cause d'une rapide métabolisation par des enzymes ou en réponse à l'activation d'anticorps par exemple. De plus, une administration intraveineuse permet de toucher des tissus en profondeurs mais la distribution du médicament n'est pas toujours maîtrisée. C'est le problème majeur des chimiothérapies actuelles qui, au lieu d'exercer leur action anticancéreuse uniquement au niveau de la tumeur, le fond également au niveau d'autres tissus entrainant des effets toxiques imprévus et diminuant l'index thérapeutique de la molécule anticancéreuse. Pour pallier aux difficultés des médicaments à atteindre leurs cibles thérapeutiques, le principe de nanovecteur ou nanoparticule a été développé avec pour rôle d'encapsuler et de véhiculer le principe actif vers sa cible. En effet, l'encapsulation des médicaments va permettre de les protéger de la dégradation et d'augmenter leur biodisponibilité. De plus, ces nanovecteurs vont permettre d'améliorer le ciblage des principes actifs soit par des mécanismes passifs d'endocytose ou soit par des mécanismes actifs grâce à des fonctionnalisations chimiques à leur surface. Ils vont également permettre de contourner des résistances aux médicaments conventionnels.

III.1.3. Applications des nanoparticules

La délivrance de médicaments concerne les molécules chimiques notamment les chimiothérapies anticancéreuses mais également les agents thérapeutiques biologiques comme les thérapies géniques. Cependant, les nanoparticules possèdent également d'autres utilisations thérapeutiques comme la radiothérapie, la thermothérapie, la PDT ou encore le diagnostic :

- L'utilisation de nanoparticules dans la radiothérapie anticancéreuse va permettre de véhiculer des sources radioactives directement au niveau de la zone à traiter permettant une destruction ciblée de la tumeur. Des nanoparticules non radioactives comme les nanoparticules inorganiques d'oxyde d'hafnium (HfO_2) cristallisé possédant une densité électronique élevée peuvent également être utilisées. Lorsque ces nanoparticules ont pénétré au sein des cellules cancéreuses, elles vont absorber les rayons ionisants délivrés par la radiothérapie, et démultiplier son effet localement. Cela va permettre un différentiel très important d'efficacité de la radiothérapie dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines limitant ainsi les effets secondaires du traitement (97).
- La thermothérapie utilise les nanoparticules métalliques notamment les nanoparticules d'or en les excitant par un champ magnétique ou par la lumière laser (PTT) afin que, lors de la dissipation de l'énergie créée, il se produise un échauffement local conduisant à la destruction des cellules (98,99).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

- Les PS utilisés en PDT à visée anticancéreuse ont souvent une mauvaise biodistribution du fait de leur caractère hydrophobe et même si les PS possèdent un ciblage préférentiel pour les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines, il reste relatif. L'utilisation de nanoparticules comme vecteur va permettre le transport des PS dans la zone tumorale et donc l'augmentation de l'efficacité anticancéreuse de la PDT.
- Les nanoparticules peuvent également servir au diagnostic dans le cadre du PD. De plus, grâce à leurs propriétés intrinsèques, elles peuvent servir d'agent de contraste en imagerie par résonance magnétique (IRM).

Ainsi outre la protection des agents thérapeutiques ou diagnostiques, la principale mission des nanoparticules est de véhiculer ces agents d'intérêt vers la zone ciblée. Il faut donc que les nanoparticules possèdent des capacités particulières de vectorisation. La vectorisation des nanoparticules peut se faire par un ciblage passif et un ciblage actif.

III.2. L'effet EPR

L'utilisation de nanoparticules comme agent de ciblage repose sur des modifications de l'endothélium vasculaire dans certaines situations. En effet, dans un tissu sain, l'endothélium vasculaire est jointif, c'est à dire que les jonctions intercellulaires sont serrées empêchant le passage des nanoparticules **(Figure 43A)**. En revanche, au niveau des tumeurs, afin de permettre leur croissance rapide, une réaction angiogénique va se produire permettant l'apport élevé de nutriments et d'oxygène. Ces néo-vaisseaux irréguliers forment des petites cavités de 0,2 à 2 µm où vont pouvoir s'accumuler les nanoparticules (100,101). De plus, une réaction inflammatoire est mise en place, caractérisée par l'arrivée de macrophages et une libération importante de cytokines conduisant à une augmentation de la perméabilité vasculaire. Cette perméabilité va permettre la formation de petites ouvertures au niveau de l'endothélium vasculaire permettant le passage des nanoparticules **(Figure 43B,C)** (102). Puisque les tumeurs ne possèdent pas de vaisseaux lymphatiques fonctionnels, les nanoparticules ne sont pas évacuées des petites cavités des néo-vaisseaux et, par un phénomène de pression favorable, elles vont pouvoir quitter les vaisseaux sanguins et intégrer l'environnement tumoral (103,104).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

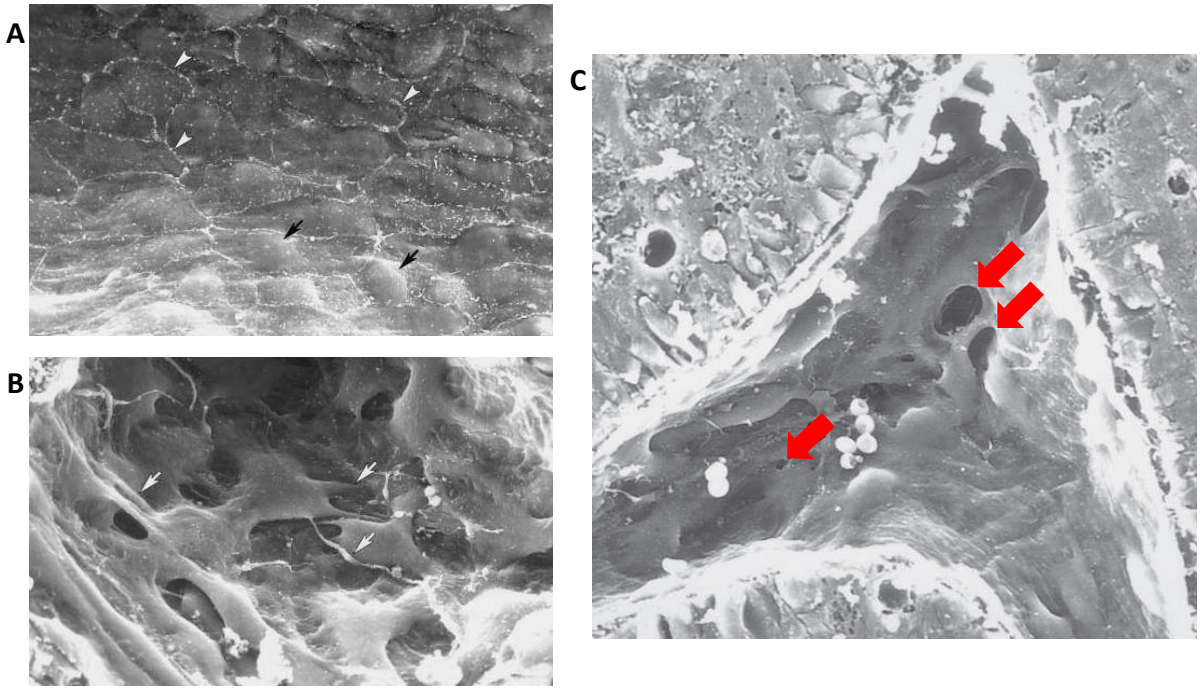


Figure 43 : la perméabilisation de l'endothélium vasculaire

A : endothélium vasculaire sain, les cellules endothéliales sont jointives d'une taille et d'une forme similaire. B et C : endothélium vasculaire tumoral, les cellules endothéliales se chevauchent et sont anormalement épaisses sans connexion normale entre les cellules formant des ouvertures dans le vaisseau (flèches rouges). Source : adapté de Hashizume *et al.*, 2000 (102)

Grâce à ces différents facteurs, une pénétration ciblée des nanoparticules au niveau de la tumeur va se produire, c'est ce qu'on appelle « l'enhanced permeability and retention effect » ou effet EPR décrit pour la première fois en 1986 par le médecin japonais Hiroshi Maeda **(Figure 44)** (105,106). L'effet EPR est également observé dans les pathologies où une réaction inflammatoire est mise en jeu.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

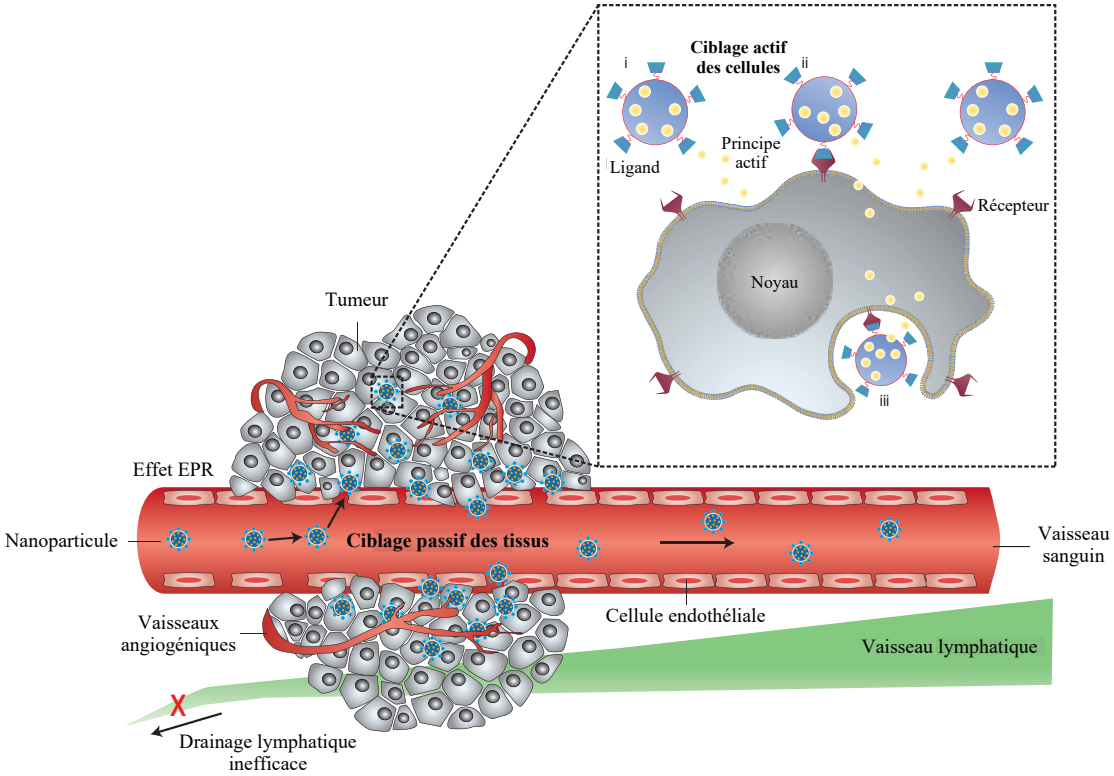


Figure 44 : l'effet EPR

Source : adapté de Peer *et al.*, 2007 (107)

Le transport des médicaments au niveau de la tumeur grâce à l'effet EPR n'est pas toujours suffisant pour avoir un bon effet thérapeutique. En effet, l'effet EPR par diffusion passive ne permet pas aux nanoparticules de cibler les cellules cancéreuses et de permettre l'incorporation intracellulaire du médicament. Il existe donc un effet EPR par ciblage actif qui repose sur les caractéristiques spécifiques des cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines. Comme les cellules cancéreuses sont en croissance continue, elles surexpriment certains récepteurs comme l'EGFR ou l'HER2. L'utilisation de ligands comme des anticorps, des sucres, des peptides ou des aptamères permettent aux nanoparticules une concentration intracellulaire au niveau des cellules cancéreuses. En revanche, l'effet EPR actif n'est pas une stratégie de ciblage à part entière puisque c'est une stratégie multi-étapes qui se met en place d'abord par le ciblage au niveau tumoral puis par le ciblage des cellules cancéreuses.

III.3. Les différents types de nanoparticules

Un grand nombre de nanoparticules ont été développées en laboratoire qu'elles soient organiques ou inorganiques. Le choix du type de nanoparticule va s'effectuer selon l'application envisagée : protection ou relargage de principes actifs, durée de vie du nanomédicament, imagerie...

Licence CC BY-NC-ND 3.0

III.3.1. Les nanoparticules organiques

Les liposomes

Les liposomes sont des vésicules formées d'une ou de plusieurs bicouches lipidiques concentriques, très souvent des phospholipides, et de molécules de cholestérol qui encapsulent un cœur interne aqueux **(Figure 45)**. Ils ont été fabriqués pour la première fois en 1964 par le biophysicien britannique Alec Bangham (108). Leur taille varie entre 30 et 150 nm de diamètre. Ils ont comme avantage de pouvoir encapsuler des composés polaires et apolaires au niveau du cœur interne aqueux. De plus, ils sont non toxiques, non immunogènes et biocompatibles, ce qui leur permet d'être des systèmes intéressants pour des applications de transport de principes actifs thérapeutiques *in vivo* (109). Ils présentent tout de même certaines limites puisqu'ils possèdent une faible capacité d'encapsulation. En effet, plus le ratio principe actif/lipide est élevé lors de la formulation des liposomes, plus ils seront instables en milieu aqueux. Le relargage précoce des principes actifs hydrophiles dans la circulation sanguine est également un problème majeur de ce type de nanoparticule.

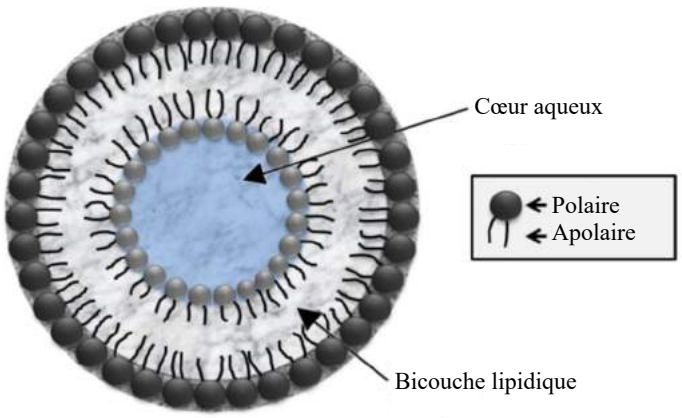


Figure 45 : liposome

Source : adapté de Steichen *et al.*, 2013 (109)

Les micelles

Les micelles sont constituées de molécules amphiphiles qui s'auto-assemblent en formant des structures de type cœur-coquille en milieu aqueux **(Figure 46)**. Le cœur est hydrophobe et la coquille extérieure est hydrophile. Leur taille est inférieure à 100 nm. Les micelles se forment lorsque la concentration micellaire critique est atteinte, c'est à dire lorsque la concentration en surfactant dans le milieu a dépassé une valeur seuil. Les molécules amphiphiles qui peuvent être lipidiques, polymériques ou hybrides, vont alors s'auto-assembler pour regrouper leurs parties hydrophobes à l'intérieur et exposer sur leur partie extérieure les domaines hydrophiles (109,110). Les problèmes majeurs de ces nanoparticules sont le faible taux de chargement en principe actif et surtout la dissociation rapide des micelles lors de l'injection intraveineuse chez le patient.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

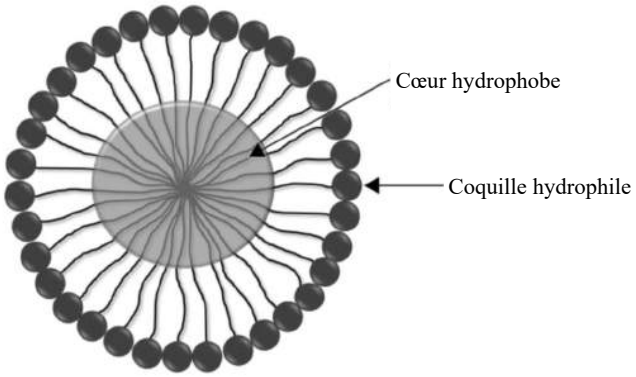


Figure 46 : micelle

Source : adapté de Steichen *et al.*, 2013 (109)

Les nanoparticules polymériques

Les premières nanoparticules polymériques ont été développées à partir de polymères biodégradables, les poly(alkyl cyanoacrylates) (PACA) **(Figure 47)**. Les nanoparticules de PACA ont démontré un taux de chargement en principe actif supérieur aux liposomes et permettent une amélioration de l'efficacité anticancéreuse de la doxorubicine au niveau tumoral et une diminution de la toxicité sur l'organisme de la doxorubicine seule (111,112). Ce composé est actuellement en phase d'essai clinique III pour le traitement des cancers hépatiques primitifs sous le nom de Livatag® aux États-Unis et en Allemagne (113).

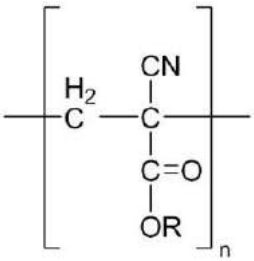


Figure 47 : poly(alkyl cyanoacrylate)

Depuis, d'autres polymères ont été développés comme le poly(acide lactique) (PLA), le poly(acide glycolique) (PGA) ou leur copolymère le poly(acide lactique-co-acide glycolique) (PLGA) **(Figure 48)**. Ces polymères biodégradables sont très souvent utilisés en raison de leur grande biocompatibilité avec les tissus humains. De plus, il est même possible de moduler les cinétiques de relargage des nanoparticules de PLGA en jouant sur la concentration de PLA et de PGA. En effet, les unités glycoliques moins hydrophobes seront plus rapidement hydrolysées. Ces nanoparticules polymériques offrent une meilleure stabilité que les liposomes et sont utilisées dans les traitements anticancéreux (114). Cependant, malgré leur forte biocompatibilité, ces polymères peuvent être cytotoxiques sous forme de nanoparticules et ils sont difficiles à produire.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

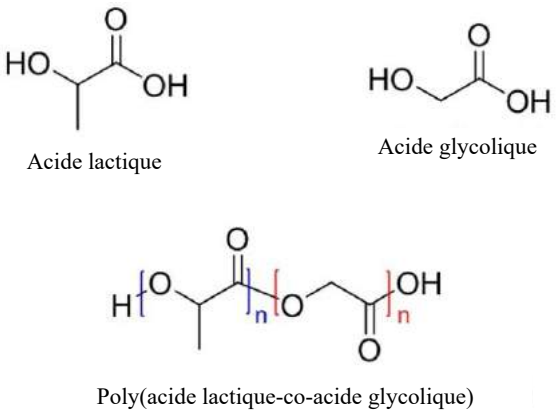


Figure 48 : monomère d'acide lactique et glycolique, copolymère le poly(acide lactique-co-acide glycolique)

Les dendrimères sont des complexes polymériques fortement branchés. À partir d'un monomère possédant des sites réactifs, ils se construisent par l'ajout contrôlé de couches successives de monomères pour arriver à une taille comprise entre 1 à 10 nm. Les dendrimères sont facilement fonctionnalisables et ils peuvent soit lier les principes actifs de façon covalente, soit les piéger au niveau de leur cœur **(Figure 49)** (115). Comme les polymères de PLGA, les dendrimères sont complexes à synthétiser et leur cytotoxicité augmente en fonction de la taille du dendrimère.

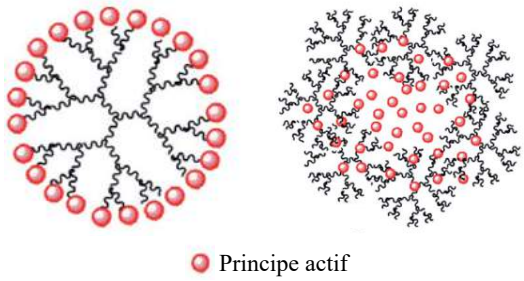


Figure 49 : dendrimères

Source : adapté de Caminade *et al.*, 2014 (115)

D'autres polymères à base de polysaccharides ont également été employés pour l'obtention de nanoparticules. La chitine est un polysaccharide naturel composé de N-acétylglucosamines liées par une liaison β(1→4) **(Figure 50)**. Lors de la déacétylation partielle de la chitine et à partir d'un degré d'acétylation en dessous de 50%, la chitine est appelée chitosane. Le chitosane est soluble dans l'eau contrairement à la chitine. L'avantage du chitosane est la présence de groupements amines qui peuvent réagir avec les entités chargées négativement comme les résidus acides sialiques des glycoprotéines des muqueuses (116). Les nanoparticules de chitosane ont également montré leur efficacité dans les traitements anticancéreux puisqu'il a été montré une efficacité anti-tumorale et une survie plus importante chez des souris présentant des tumeurs sous-cutanées traitées par des nanoparticules de chitosane encapsulant la doxorubicine en comparaison de la doxorubicine seule (117).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

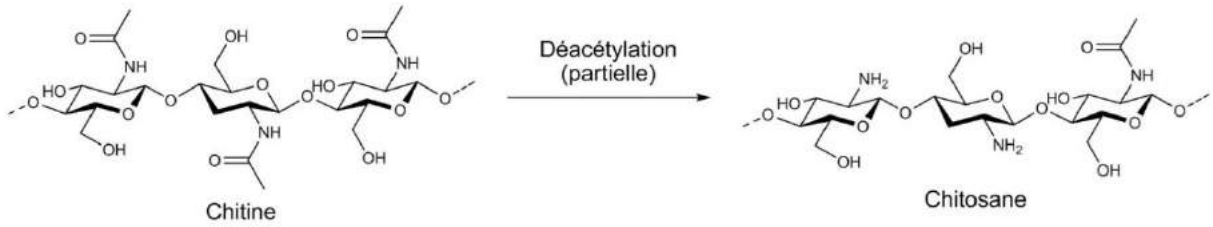


Figure 50 : structure de la chitine et du chitosane

III.3.2. Les nanoparticules inorganiques

Les nanoparticules d'oxyde de fer

Les nanoparticules d'oxyde de fer sont constituées de petites particules de maghémite (Fe_2O_3) ou de magnétite (Fe_3O_4) d'un diamètre inférieur à 20 nm. Elles ont pour particularité de pouvoir entrer dans un état appelé superparamagnétique. En effet, lorsque ces nanoparticules d'oxyde de fer sont soumises à un champ magnétique extérieur, elles alignent leur moment magnétique dans la direction du champ. Lorsque le champ disparaît, elles perdent leur aimantation immédiatement, le temps de relaxation est nul, ce qui permet de faire un contraste avec les tissus qui eux possèdent des temps différents de relaxation. Ces nanoparticules d'oxyde de fer superparamagnétiques ou SPION (« superparamagnetic iron oxide nanoparticles ») sont notamment utilisées en IRM seules, fonctionnalisées par des ligands de ciblage ou incorporées dans des nanoparticules encapsulant un principe actif pour un suivi d'imagerie (118,119). Comme toutes les nanoparticules, les nanoparticules d'oxyde de fer peuvent améliorer le ciblage tumoral par effet EPR passif et actif ou non. Cependant, de par leur capacité magnétique, un troisième ciblage déclenché est possible. Il est possible d'attirer les nanoparticules magnétiques au niveau tumoral grâce à un aimant placé à cet endroit permettant ainsi un ciblage tumoral encore plus important **(Figure 51)** (120). Ces nanoparticules sont également très utilisées dans les traitements anticancéreux par hyperthermie. En effet, lors de l'application d'un champ magnétique, la température des nanoparticules va augmenter détruisant les cellules tumorales à proximité. Cette technologie a même été approuvée en clinique pour le traitement des glioblastomes sous le nom de NanoTherm^{TM} (121).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

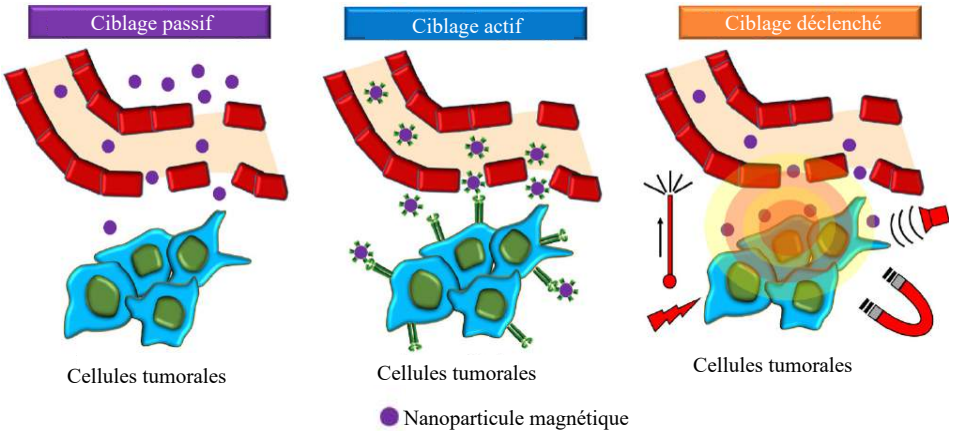


Figure 51 : ciblage déclenché par aimant des nanoparticules magnétiques

Source : adapté de Martinelli *et al.*, 2019 (120)

Les nanoparticules d'or

Les nanoparticules d'or peuvent être de différentes formes : sphères, étoiles, bâtonnets, cages... de 2 à 200 nm **(Figure 52)**. Le choix de telle ou telle nanoparticule d'or est important car leur biodistribution est dépendante de leur forme et de leur taille. En effet, les nanosphères possèdent un temps de circulation sanguine plus important et sont facilement internalisées par les cellules. En revanche, elles ne sont internalisées qu'en surface de la tumeur alors que les nanocages ou les nanobâtonnets le sont plus en profondeur (122).

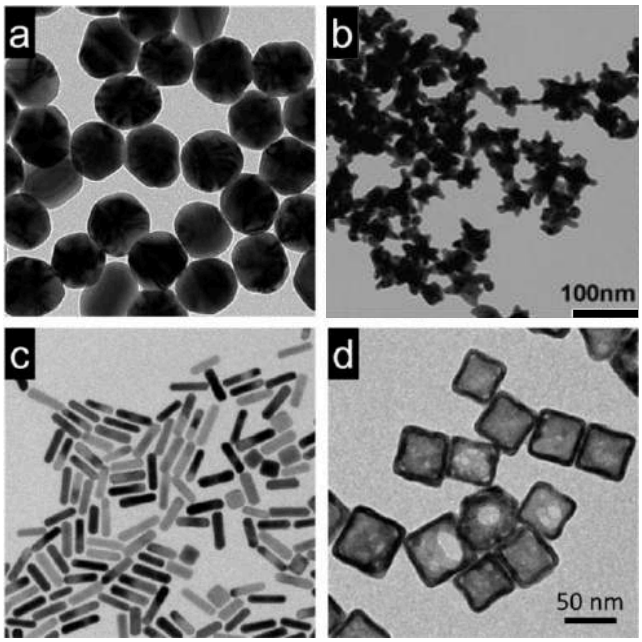


Figure 52 : nanoparticules d'or

A : nanosphères d'or. B : nanoétoiles d'or. C : nanobâtonnets d'or. D : nanocages d'or. Images en microscopie électronique à transmission. Source : adapté de Black *et al.*, 2014 (122)

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Les nanoparticules d'or ont pour avantage d'être facilement fonctionnalisables et de posséder des propriétés physiques intéressantes des nanoparticules métalliques. En effet, lorsqu'elles sont exposées à la lumière, l'oscillation du champ électromagnétique va induire une oscillation du nuage d'électrons présents à la surface de la nanoparticule, c'est l'effet plasmonique de surface. Lorsque l'amplitude d'oscillation atteint son maximum à une longueur d'onde précise, c'est l'effet résonnance plasmonique de surface, les nanoparticules d'or sont alors capables d'absorber fortement la lumière. Grâce à ces caractéristiques, les nanoparticules d'or sont très utilisées dans les diagnostiques cancéreux en imagerie. Elles sont également très utilisées en PTT mais aussi en PDT (123). En effet, il a été démontré une efficacité synergique de la PTT par l'utilisation de nanoparticules d'or et de la PDT grâce au PS vert d'indocyanine. La combinaison de la PTT et PDT a permis une inhibition complète de la croissance tumorale induite par xénogreffes chez la souris alors que des effets moindres ont été observés par l'utilisation de la PTT seule ou de la PDT seule (124).

Les nanoparticules de silice

Depuis plusieurs années, les nanoparticules de silice apparaissent comme des nanovecteurs très prometteurs. En effet, elles ont de nombreux avantages comme d'être stables et de résister à la corrosion dans les milieux physiologiques à la différence des nanoparticules organiques. Elles sont facilement synthétisables, leur taille peut être contrôlée et elles sont facilement modifiables et fonctionnalisables. De plus, elles peuvent transporter une quantité de principe actif beaucoup plus importante que les nanoparticules organiques (125). Les nanoparticules de silice représentent une des nanoparticules les plus biocompatibles leur conférant un intérêt majeur par rapport aux nanoparticules inorganiques comme l'or ou l'oxyde de fer qui sont peu dégradables. Les nanoparticules de silice peuvent se présenter sous différentes formes **(Figure 53)**. Les nanoparticules de silice mésoporeuse (MSNs) sont des nanoparticules utilisées pour l'administration de médicaments. Les principes actifs sont alors introduits au niveau du cœur des MSNs et il est possible de contrôler le relargage des principes actifs au niveau des pores. Cela permet de protéger les principes actifs et de diminuer les effets secondaires au niveau de l'organisme. Des nanoparticules de silice non mésoporeuse sont également utilisées afin de pallier aux problèmes de relargage des principes actifs au sein des MSNs. En effet, les MSNs par effet EPR permettent d'amener le principe actif au niveau tumoral, mais si son relargage au niveau cellulaire n'est pas possible ou optimal, les traitements anticancéreux ne seront pas efficients. C'est notamment le cas avec les PS embarqués dans les MSNs pour la PDT car, si le PS n'est pas accessible, il ne pourra pas être activé par la lumière. Les nanoparticules de silice peuvent être associées à des agents magnétiques sous forme cœur/coquille et utilisées en imagerie. Ces nanoparticules permettent de par les agents magnétiques une visualisation en imagerie par IRM et de par la silice une fonctionnalisation avec des agents de ciblage par exemple et une meilleure biocompatibilité qu'une nanoparticule magnétique.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

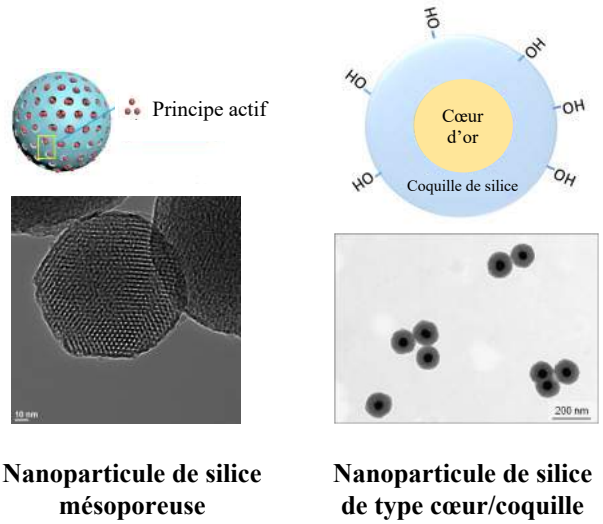


Figure 53 : nanoparticules de silice

Source : adapté de Huang *et al.*, 2018 (126) et Homan *et al.*, 2015 (127)

Depuis la découverte des MSNs au début des années 2000 (128), elles sont largement étudiées dans l'administration de médicaments chimiothérapeutiques, de PS pour la PDT et même en thérapie génique (129–131). L'intérêt de l'encapsulation de la camptothécine, une molécule chimiothérapeutique très hydrophobe limitant son utilisation clinique, dans les MSNs a été démontré. En effet, *in vivo* à partir de xénogreffes de cancer du sein, le traitement des tumeurs par la camptothécine encapsulée dans les MSNs a permis de diminuer de façon significative le volume tumoral par rapport à la camptothécine seule (132). Ces nanoparticules sont également intéressantes en PDT puisqu'il a été montré que l'encapsulation de la 2-devinyl-2-(1-hexyloxyéthyle) pyrophéophorbide (HPPH) (133) ou du bleu de méthylène (134) dans les MSNs augmentait l'efficacité anticancéreuse comparé au PS seul. La combinaison d'une molécule chimiothérapeutique et d'un PS encapsulés dans les MSNs a été démontrée comme permettant un effet anticancéreux synergique tout en augmentant le ciblage tumoral (135).

III.4. Les nanoparticules de première génération

La première génération de nanoparticules regroupe tous les nanovecteurs n'ayant subi aucune modification chimique de leur surface. L'un des principaux problèmes des médicaments est l'élimination par filtration rénale de ces molécules par l'organisme. La première génération de nanoparticules était constituée de colloïdes stables en milieu aqueux permettant d'éviter l'élimination et l'excrétion par le système rénal. Physiologiquement, les reins ont pour rôle la filtration à travers des pores de quelques nanomètres. L'encapsulation des médicaments au sein de vecteurs colloïdaux de plusieurs dizaines de nanomètres permet donc d'éviter la filtration rénale. En revanche, malgré la petite taille des nanoparticules, elles sont quand même considérées comme des corps étrangers par les défenses immunitaires de l'organisme. Il a été démontré que les nanoparticules de première génération s'accumulaient préférentiellement au niveau des tissus du système réticulo-endothélial, principalement au niveau du foie.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

En effet, les opsonines vont venir se lier aux nanoparticules et vont être rapidement reconnues par les macrophages hépatiques d'où l'accumulation importante des nanoparticules au niveau du foie.

Ce phénomène permet un ciblage hépatique très important permettant le développement de traitements plus efficaces des pathologies sévères du foie comme les hépatocarcinomes résistants ou les métastases hépatiques. En effet, il a été montré que l'encapsulation de la doxorubucine, molécule de chimiothérapie anticancéreuse, dans une nanomatrice de PACA permettait de diminuer fortement la dose de principe actif nécessaire au traitement. Dans cette étude, certes la doxorubicine seule permet de diminuer le nombre de métastases mais à des doses très élevées où certains animaux meurent non plus des métastases hépatiques mais de la toxicité cardiaque de la doxorubicine. En revanche, pour une diminution similaire du nombre de métastases, il faut des doses bien inférieures de doxorubicine encapsulée (136). La nanoparticule permet donc une meilleure concentration du principe actif au niveau de l'organe cible tout en diminuant la toxicité.

La vectorisation par des nanoparticules permet également de réduire le phénomène de résistance multiple aux anticancéreux (MDR). Qu'il soit primaire ou secondaire, ce phénomène MDR est dû à la présence de glycoprotéines dans la membrane des cellules cancéreuses. En effet, des pompes d'efflux, comme le récepteur de la glycoprotéine P, par son activité adénosine triphosphat (ATP)ase est capable d'expulser des substances exogènes xénobiotiques comme les chimiothérapies. Il a été montré que l'encapsulation de la doxorubicine dans une nanomatrice de poly(hexyl cyanoacrylate) permettait d'outrepasser ce phénomène MDR. En effet, à des doses similaires en principes actifs sur des greffes d'hépatocarcinomes résistants chez la souris, seul la doxorubicine encapsulée avait un effet anticancéreux (137).

En revanche, malgré le fort intérêt des nanoparticules de première génération pour les pathologies hépatiques, de nombreuses tumeurs se trouvent dans d'autres tissus. Le développement de nouvelles nanoparticules moins reconnues par les macrophages a donc été mis en place.

III.5. Les nanoparticules de deuxième génération

L'objectif des nanoparticules de deuxième génération est d'augmenter la durée de vie de la nanoparticule dans la circulation sanguine afin de lui permettre de s'accumuler au niveau des tissus cibles. Les nanoparticules sont reconnues par les opsonines et phagocytées majoritairement par les cellules de Kupffer du foie. Afin de contourner cette détection, les nanoparticules sont recouvertes d'agent de furtivité (138,139). Des chaînes de polymères hydrophiles et flexibles vont donc décorer la surface des nanoparticules. Le polyéthylène glycol (PEG) ou poly(oxyde d'éthylène) (POE) est le polymère le plus souvent utilisé du fait de sa biocompatibilité importante **(Figure 54)**. Il est soluble en milieu aqueux, non toxique et possède une faible immunogénicité et antigénicité. Il a été montré que la PEGylation de liposomes, c'est à dire le fait de fonctionnaliser les liposomes par une couche de PEG, apportait à la surface des liposomes une concentration locale en molécules d'eau élevée.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Cela va permettre de créer une gêne stérique et d'empêcher les interactions avec les opsonines augmentant ainsi la furtivité des liposomes (140).

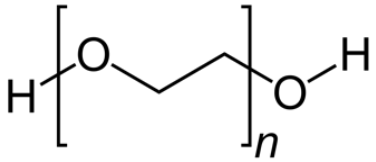


Figure 54 : structure du polyéthylène glycol (PEG)

n représente le nombre moyen de groupes oxyéthyléniques (n ≥ 4). Lorsque la masse est > 20 000 g/mol, ces polyéthers sont plus communément dénommés poly(oxyde d'éthylène) (POE).

Malgré l'amélioration de la pharmacocinétique des nanoparticules apportée par les groupements PEG, il a été démontré un effet mémoire envers les groupements PEG (141). En effet, lors de la seconde injection de nanoparticules PEGylées, l'élimination des nanoparticules est accélérée. C'est l'effet ABC pour « l'accelerated blood clearance ». Quelques jours après l'injection de nanoparticules PEGylées, un anticorps spécifique anti-PEG (IgM anti-PEG) est produit par la rate. Lors de la seconde injection, si les anticorps sont toujours présents alors ils vont pouvoir complexer les groupements PEG, activer l'opsonisation et donc éliminer les nanoparticules (142). Pour pallier cet effet ABC, d'autres chaînes de polymères peuvent être utilisées comme le xylane **(Figure 55)**. Le xylane est une hémicellulose naturelle, biodégradable et non toxique (143). Il a été montré que le xylane stabilisait les nanoparticules magnétiques en milieu biologique en augmentant leur biocompatibilité et leur biodistribution (144). Une étude a montré que l'estérification du xylane avec l'ibuprofène permettait l'auto-assemblage en nanoparticules sphériques hautement chargées en ibuprofène augmentant sa biodisponibilité (145). De plus, des études ont montré l'intérêt du xylane comme agent de ciblage tumoral puisqu'il permet d'améliorer l'efficacité des molécules anticancéreuses hydrophobes. En effet, en association au 5-FU ou à la curcumine, il permet d'augmenter l'efficacité anticancéreuse de ces composés sur des cellules humaines de CCR en comparaison des composés seuls (146,147).

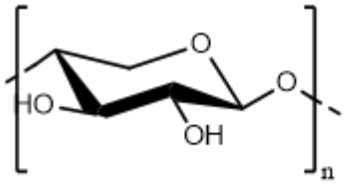


Figure 55 : structure du xylane

Les nanoparticules de deuxième génération permettent de véhiculer sélectivement les médicaments au niveau des tissus cancéreux autre que le foie par rapport à celles de première génération.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Cependant, les nanoparticules se trouvent dans l'espace interstitiel et ne pénètrent pas forcement dans les cellules cancéreuses afin de permettre l'effet anticancéreux du médicament vectorisé. C'est pourquoi des nanoparticules de troisième génération sont développées pour permettre l'incorporation cellulaire du médicament.

III.6. Les nanoparticules de troisième génération

Afin de permettre une pénétration des nanoparticules à l'intérieur des cellules cancéreuses, une troisième génération de nanoparticules a été développée. Cette nouvelle technologie repose sur les mêmes fondamentaux que les PS de troisième génération. En effet, de par leur croissance importante, les cellules cancéreuses surexpriment un grand nombre de récepteurs par rapport aux cellules saines. Les nanoparticules de troisième génération sont donc équipées de ligands permettant, lors de la reconnaissance avec le récepteur spécifique, une internalisation du médicament. On parle d'effet EPR actif. Cependant, l'ajout de ces ligands à la surface des nanoparticules favorise leur reconnaissance par les opsonines (148), il est donc important d'associer ces agents de ciblage à des nanoparticules recouvertes d'agents de furtivité. L'efficacité d'une association de nanoparticules furtives avec des ligands a été démontrée dans de nombreuses études. Les ligands sont notamment des anticorps dirigés contre le récepteur EGFR ou HER2, des sucres, des peptides, des aptamères, des glycosaminoglycanes comme l'acide hyaluronique ou encore des vitamines comme l'acide folique.

En effet, toutes les cellules vivantes nécessitent des apports en vitamines comme l'acide folique. De par leur division importante, les cellules cancéreuses ont un besoin particulièrement plus élevé en vitamines. Il a été montré que dans les cancers de l'ovaire, les cellules surexprimaient le récepteur de l'acide folique. Les bras PEG de nanoparticules biodégradables ont été fonctionnalisés à leurs extrémités par des amines afin de pouvoir les coupler avec la fonction acide carboxylique de l'acide folique. Ces nouvelles nanoparticules furtives et pourvues d'un agent de ciblage des cellules cancéreuses sont retrouvées dans les cellules grâce à un phénomène d'endocytose alors que les nanoparticules sans acide folique ne le sont pas (149,150).

Depuis quelques années, plusieurs nanoparticules de troisième génération sont au stade clinique (151). Cependant, bien que tous ces nouveaux traitements aient démontré une efficacité significativement supérieure lors des tests précliniques par rapport à leurs homologues non fonctionnalisés par des agents de ciblage, aucun n'a encore reçu d'autorisation de mise sur le marché (AMM).

III.7. Les nanoparticules dans les traitements anticancéreux

Actuellement, seulement quelques traitements à base de nanoparticules sont autorisés dans le traitement des cancers (152,153). L'utilisation de ces nanomédicaments permet dans la majorité des cas une augmentation du ciblage tumoral et une diminution de la toxicité systémique.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

On retrouve parmi ces nanomédicaments, essentiellement des liposomes PEGylés ou non, des micelles, des polymères, des nanoparticules d'albumine ou des nanoparticules de fer :

- SMANCS : nanoparticules polymériques associées à la néocarzinostatine approuvé dans le traitement des cancers hépatiques depuis 1992 au Japon.
- Doxil® : liposomes PEGylés associés à la doxorubicine approuvé dans le traitement des sarcomes de Kaposi associés au SIDA, les cancers résistants des ovaires et les myélomes multiples depuis 1995 par la FDA et depuis 2016 par l'AEM uniquement pour les cancers résistants des ovaires sous le nom de Caelyx®.
- DaunoXome® : liposomes associés à la daunorubicine approuvé dans le traitement des sarcomes de Kaposi associés au SIDA depuis 1996 par la FDA et depuis 2014 par l'AEM.
- Onivyde™ : liposomes PEGylés associés à l'irinotécan approuvé dans le traitement des adénocarcinomes métastatiques du pancréas, chez les patients en progression après un traitement à base de gemcitabine depuis 1996 par la FDA et depuis 2017 par l'AEM.
- Abraxane® : nanoparticules d'albumine associées au paclitaxel approuvé pour le traitement des cancers métastatiques du sein et des adénocarcinomes métastatiques du pancréas depuis 2005 par la FDA et depuis 2014 par l'AEM.
- Genexol-PM® : micelles associées au paclitaxel approuvé dans le traitement des cancers du sein et des cancers pulmonaires non à petites cellules depuis 2007 en Corée.
- NanoTherm™ : nanoparticules de fer approuvé dans le traitement par hyperthermie magnétique des glioblastomes depuis 2012 par l'AEM (121).
- Mepact® : liposomes associés à la mifamurtide approuvé dans le traitement des ostéosarcomes non métastatiques de haut grade résécables chez les patients de moins de 30 ans depuis 2010 par l'AEM.
- Marqibo® : liposomes associés à la vincristine sulfate approuvé dans le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques depuis 2012 par la FDA.
- Myocet® : liposomes associés à la doxorubicine approuvé dans le traitement des cancers métastatiques du sein depuis 2018 par l'AEM.

Cependant, malgré la faible diversité des nanomédicaments approuvés qui sont de plus pour la majorité des traitements chimiothérapeutiques non vectorisés, d'autres nanomédicaments commencent à se développer dans de nombreuses études cliniques déjà bien avancées. C'est le cas notamment pour la radiothérapie avec une étude clinique de phase II/III utilisant des nanoparticules inorganiques d'oxyde d'hafnium pour le traitement des sarcomes (97). Les liposomes couplés aux ARN interférents dirigés contre des acteurs de la mort cellulaire comme p53 ou Bcl-2 présentent des résultats prometteurs dans des études cliniques de phase II dans les glioblastomes récurrents et les lymphomes non hodgkiniens (154,155).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Les chimiothérapies ciblées utilisant notamment des liposomes couplés à des ligands de l'HER2 sont actuellement en phase II/III pour les cancers du sein HER2 positif (156). Enfin, les combinaisons de chimiothérapies sont également à l'étude par l'utilisation de liposomes associés à l'irinotécan et la floxuridine en phase II pour le traitement des CCR avancés (157).

III.8. Les nanoparticules et la thérapie photodynamique dans le traitement du cancer colorectal

Aujourd'hui aucune étude clinique n'est en cours sur des nanomédicaments en PDT que ce soit pour les CCR ou les cancers en général. La nanomédecine étant une discipline émergente, de nombreuses études précliniques ont été réalisées pour les traitements anticancéreux mais peu pour le traitement des CCR par PDT. Néanmoins, il a été démontré l'intérêt majeur de la vectorisation des PS par des nanoparticules dans le traitement des CCR. En effet, l'intérêt de l'encapsulation de la tétrakis (4-hydroxyphényl) porphyrine (p-THPP) dans des liposomes PEGylés a été démontré. Une accumulation sélective des nanomédicaments a été mise en évidence ainsi qu'une augmentation de l'efficacité anticancéreuse par PDT sur 2 lignées cellulaires humaines de cancer de la prostate et de CCR (158). Ces résultats ont également été retrouvés avec l'utilisation de nanoparticules de silice couplées à la PpIX dans 2 lignées cellulaires humaines de CCR (159). L'importance de la furtivité des nanoparticules a été démontrée *in vivo* par l'utilisation de micelles préparées à partir de PLA PEGylés ou non embarquant la *m*-THPC. À partir de xénogreffes d'une lignée cellulaire humaine de CCR sur des souris nude, le ciblage tumoral des nanoparticules PEGylées est beaucoup plus important que les non PEGylées (160). De plus, la furtivité de la nanoparticule est importante mais la façon dont le médicament est fixé sur la nanoparticule l'est également. En effet, la méthode de fixation de la Npe6 par chargement sur des nanoparticules de chitosane (HGC-Npe6) ou de conjugaison (GC-Npe6) s'auto-assemblant en nanoparticules sphériques stables dans les milieux aqueux joue un rôle important dans le ciblage tumoral. *In vitro*, les 2 nanoparticules présentent le même rendement en oxygène singulet mais l'HGC-Npe6 possède une meilleure phototoxicité de par son relargage plus rapide de la Npe6. En revanche *in vivo*, à partir de xénogreffes d'une lignée cellulaire humaine de CCR, l'HGC-Npe6 ne présente qu'une faible accumulation tumorale. La nanoparticule GC-Npe6 quant à elle, de par son temps de circulation sanguin plus élevé, est préférentiellement accumulée au niveau tumoral. Ces caractéristiques sont également retrouvées au niveau de l'efficacité anticancéreuse puisque 20 jours post-traitements les volumes tumoraux sont d'environ 60 mm^3 pour le traitement GC-Npe6 alors qu'ils sont de 560 mm^3 pour HGC-Npe6 et 760 mm^3 pour la Npe6 seule (161). Depuis quelques années, des études portant sur des nanoparticules de troisième génération ont vu le jour. En effet, il a été démontré l'intérêt anticancéreux de la fixation de jacaline, une lectine capable d'interagir avec les antigènes glucidiques, ou des anticorps anti-HER2 sur des nanoparticules dans le traitement de lignées cellulaires humaines de CCR (162). C'est également le cas lors de la fixation d'anticorps ciblant un des récepteurs de mort 5 (DR5) sur lequel peuvent se fixer les récepteurs au « TNF related apoptosis inducing ligand » (TRAIL) sur des nanoparticules de chitosane (163). Afin d'améliorer les traitements anticancéreux, des études cherchent à étudier la combinaison de la chimiothérapie et de la PDT.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Il a été démontré un effet anticancéreux synergique d'une nanoparticule polymérique contenant de l'oxaliplatine en son cœur et d'un conjugué lipide-pyrophéophorbide dans son enveloppe dans le traitement des CCR avancés (164).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Chapitre IV. L'apoptose

Ce n'est qu'au début des années 1970 que Kerr, Wyllie et Currie décrivent pour la première fois une autre mort cellulaire que la nécrose (165). Au cours de leurs recherches, ils ont observé un type de mort cellulaire programmée aux caractéristiques morphologiques très particulières par rapport à la nécrose, tout d'abord nommée nécrose contractée, ils la désignent au final comme mort cellulaire programmée ou apoptose.

La nécrose est une mort cellulaire accidentelle impliquant plusieurs cellules lors d'un dommage tissulaire. Elle se caractérise par un gonflement cellulaire jusqu'à une rupture de la membrane plasmique engendrant un déversement du contenu cellulaire au niveau des tissus environnants. Une inflammation locale est alors mise en place suite au déversement des enzymes et de substances inflammatoires présentes dans le cytosol.

L'apoptose est une mort cellulaire programmée qui permet l'élimination de cellules endommagées, potentiellement dangereuses pour l'organisme ou en excès. L'apoptose cellulaire suit un processus précis, la cellule va d'abord s'arrondir et se réduire en taille. Au niveau du noyau, la chromatine va se condenser puis se fragmenter. Ensuite, la membrane plasmique de la cellule va bourgeonner formant des corps apoptotiques remplis de débris cellulaires comme les organelles et les fragments nucléaires. Ces débris vont ensuite être phagocytés et dégradés par les macrophages. L'apoptose, contrairement à la nécrose, n'induit pas d'inflammation puisqu'il n'y a pas de rupture de la membrane plasmique. L'apoptose apparaît donc comme une mort cellulaire hautement régulée alors que la nécrose donne l'image d'un phénomène anarchique et désordonné à caractère explosif **(Figure 56)** (166).

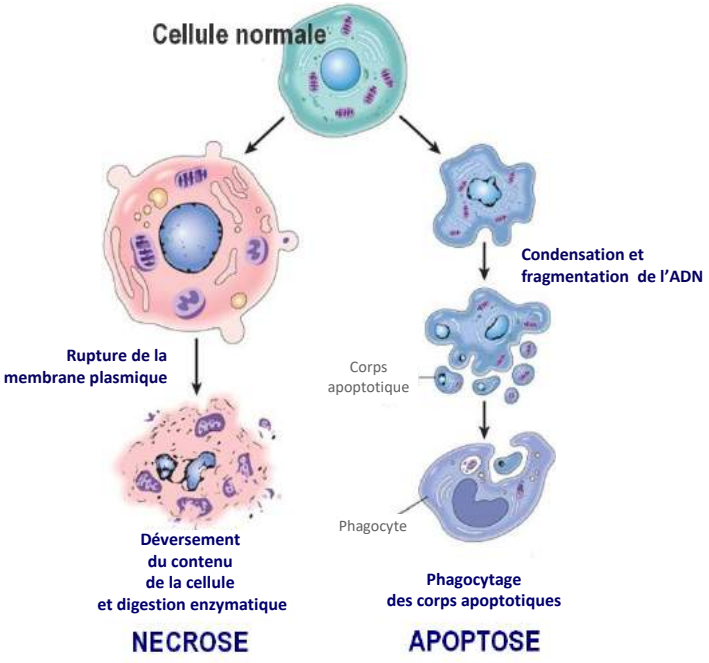


Figure 56 : mort cellulaire par nécrose ou par apoptose

Source : manuscrit de thèse Julien Farard, 2008

Licence CC BY-NC-ND 3.0

IV.1. Les rôles physiologiques de l'apoptose

L'apoptose joue un rôle tout au long de la vie d'un organisme puisqu'elle est nécessaire pour le développement tout comme pour le maintien de l'homéostasie tissulaire à l'âge adulte (167). Lors de l'embryogenèse, l'apoptose permet de détruire des structures initialement mises en place. C'est notamment le cas lors de la différenciation sexuelle de l'embryon. Lorsqu'il est génétiquement masculin, l'hormone anti-mullërienne (AMH) sécrétée par les cellules de Sertoli, situées dans les testicules, induit la dégénérescence des canaux de Müller par apoptose tandis que la testostérone sécrétée par les cellules de Leydig permet le maintien des canaux de Wolff. Lorsque l'embryon est génétiquement féminin, l'AMH et la testostérone ne sont pas sécrétées du fait de l'absence de testicule ce qui va permettre aux canaux de Müller de persister et aux canaux de Wolff de régresser (168). L'apoptose joue également un rôle lors de la morphogenèse des doigts où elle permet la mort des cellules de l'espace interdigital généré au début de l'embryogenèse. Un défaut de son activité conduit à une absence de différenciation des doigts **(Figure 57)**. L'apoptose est retrouvée également lors de la mise en place des systèmes nerveux ou immunitaires. En effet, lors du développement embryonnaire, les neurones sont générés en excès et ceux qui ne sont pas connectés correctement à leur cible vont être éliminés par apoptose. C'est la même chose lors du développement du système immunitaire où les lymphocytes T et B auto-immuns seront éliminés par apoptose afin d'éviter les risques de réactions immunitaires. Chez l'adulte, l'apoptose intervient également pour maintenir l'homéostasie de l'organisme pour contrôler le nombre de cellules et la taille des tissus. Elle intervient notamment au niveau des tissus à fort renouvellement comme au niveau de la peau, après une réaction immunitaire pour éliminer l'excès de lymphocytes T ou encore pour éliminer les cellules vieillissantes ou défectueuses.

Figure 57 : activité apoptotique défectueuse lors de la différentiation de deux orteils

Source : l'apoptose - RTS

L'importance de l'apoptose dans l'homéostasie tissulaire d'un individu explique pourquoi son dérèglement peut être à l'origine de nombreuses pathologies comme les maladies auto-immunes, les maladies neurodégénératives, des anomalies du développement ou encore le développement de cancers (169).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

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

L'apoptose est une forme de mort cellulaire très contrôlée dépendante de différents facteurs. Elle résulte de l'activation d'un processus préétabli d'interactions moléculaires en réponse à des stimuli. Selon la nature du signal, qu'il soit intra ou extracellulaire, l'apoptose peut se dérouler selon 2 voies principales d'induction : la voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque et la voie mitochondriale ou voie intrinsèque. Quelle que soit la voie empruntée, l'apoptose peut classiquement être divisée en 3 étapes :

- Une phase d'initiation qui est réversible où le signal apoptotique est transmis à des caspases initiatrices par des molécules adaptatrices.
- Une phase d'exécution non réversible où les caspases exécutrices vont engendrer le processus apoptotique.
- Une phase de dégradation cellulaire.

IV.2.1. Les caspases, acteurs clés de l'apoptose

Les caspases, quel que soit leur rôle, font partie de la famille des « cysteine-aspartic protease » ou cystéine-protéases car elles possèdent un résidu cystéine au cœur de leur site catalytique. Initialement sous forme de procaspases, elles ne sont que des précurseurs dépourvus d'activité enzymatique ou zymogène. Cependant après activation, elles deviennent des enzymes actives capables de cliver un large éventail de substrats grâce au site catalytique comprenant un résidu cystéine localisé dans un motif Q (glutamine) – A (alanine) - C (cystéine) – X - G (glycine) où le résidu X peut être une R (arginine), une Q ou une G.

IV.2.1.1. Structure des caspases

La famille des caspases comprend plusieurs membres dont le nombre diffère selon les espèces. Elles sont majoritairement exprimées dans la totalité de l'organisme à l'exception de la caspase 14 qui est exprimée uniquement au niveau des kératinocytes (170). Chez l'homme, 13 caspases ont été identifiées et elles peuvent être classifiées selon 3 grands groupes. Les caspases impliquées dans le processus inflammatoire avec les caspases 1, 4, 5 et 12 représentent le premier groupe. Le second groupe est constitué des caspases impliquées dans l'apoptose. Il est divisé en 2 sous-groupes avec les caspases initiatrices 2, 8, 9 et 10 et les caspases effectrices 3, 6 et 7. Le dernier groupe est constitué de caspases particulières, les caspases 14 ou 16 avec des rôles très spécifiques. Cependant, l'ensemble des caspases présente une homologie de structure **(Figure 58)** (171) :

- Un pro-domaine N-terminal de longueur variable selon le type de caspase. Les caspases initiatrices possèdent un long pro-domaine présentant des motifs d'interaction protéine-protéine « death effector domain » (DED) et « caspase activation and recruitment domain » (CARD) tandis que les caspases effectrices présentent plutôt un court pro-domaine.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

- Une grande sous-unité p20 de 20 kDa qui possède le site catalytique avec la présence de la région QACXG.
- Une petite sous-unité carboxyterminale p10 de 10 kDa présente chez toutes les caspases à l'exception de la forme courte de la caspase 12.

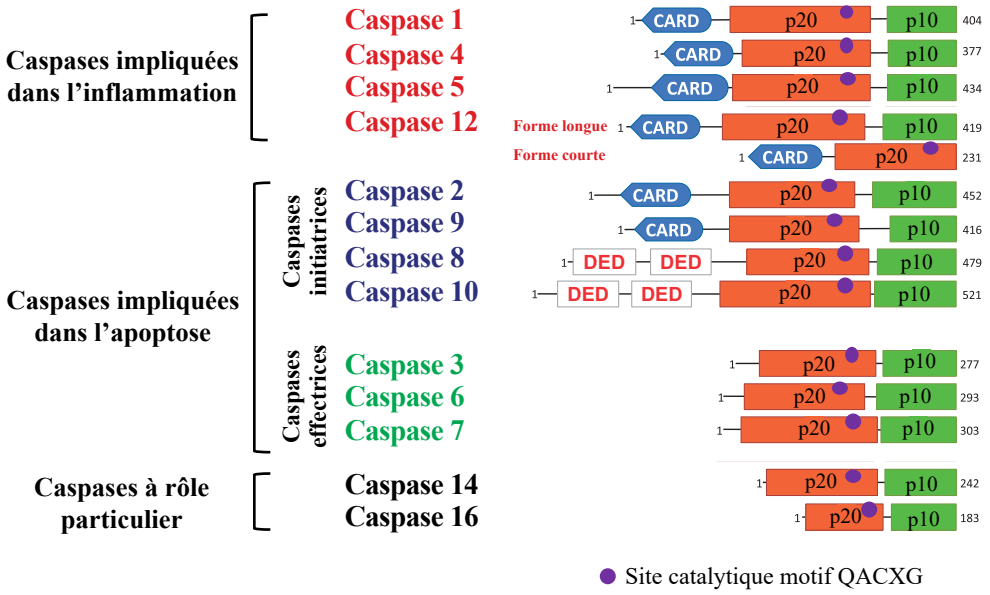


Figure 58 : homologie de structure des caspases humaines

Source : adapté de Shalini *et al.*, 2015 (171)

IV.2.1.2. Activation des caspases

L'activation des caspases se fait par clivage protéolytique au niveau des résidus aspartates situés entre les différentes sous-unités par d'autres caspases ou par elles-mêmes grâce à leur activité auto-catalytique provoquant la dimérisation des formes zymogènes. Un premier clivage permet de libérer la petite sous-unité p10 mais qui va rester en contact avec la grande sous-unité. Malgré la présence du site catalytique au niveau de la grande sous-unité p20, son activité est dépendante de sa liaison avec la petite sous-unité. Un second clivage va permettre la libération du pro-domaine. Par homodimérisation, l'enzyme active sera alors formée et composée de 2 hétérodimères actifs p20p10 comprenant chacun un site catalytique situé à l'extrémité de la molécule formée **(Figure 59)** (172).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

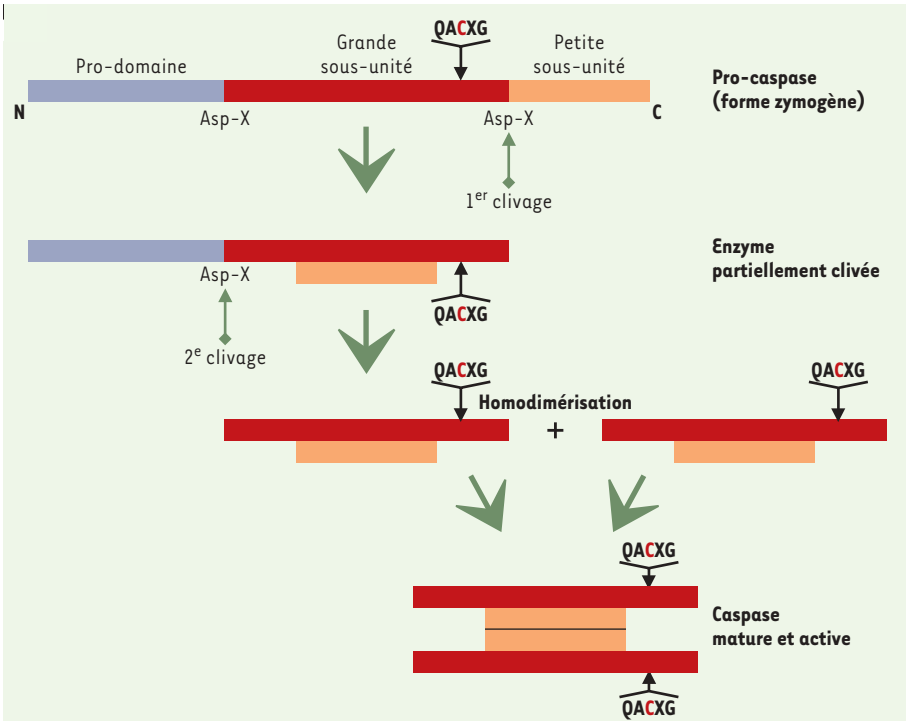


Figure 59 : activation des caspases

Source : Couzinet *et al.*, 2002 (172)

IV.2.1.3. Action des caspases

Les caspases sont capables de cliver des centaines de substrats. Bien que les caspases initiatrices ont comme substrat les caspases effectrices, ces dernières sont capables de cliver plus de 1500 substrats qui à terme conduiront à la mort de la cellule (173). Parmi ces nombreux substrats on retrouve :

- Des protéines directement impliquées dans la régulation de l'apoptose ou des caspases elles-mêmes.
- Des protéines médiatrices et régulatrices de la transduction du signal apoptotique.
- Des protéines impliquées dans le maintien de l'intégrité structurale du cytosquelette et du noyau comme les kératines, les lamines ou l'actine qui vont jouer un rôle dans la condensation nucléaire et les changements morphologiques des cellules apoptotiques.
- Des protéines responsables de la transcription ou de la réparation de l'ADN telle que la poly(ADP-ribose)-polymérase (PARP) qui est impliquée dans le maintien de l'intégrité génomique. Une fois clivée par les caspases, la PARP n'est plus capable d'exercer son effet réparateur sur les dommages à l'ADN.
- Des protéines régulatrices du cycle cellulaire permettant d'empêcher les voies de survie cellulaire.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

IV.2.1.4. Régulation des caspases

Au niveau cellulaire, l'activation ou l'inactivation des caspases est un phénomène contrôlé par différents mécanismes. Tout d'abord, la régulation peut être effectuée par une famille de protéines, les « inhibitor apoptosis proteins » (IAPs), telle que c-IAP1, cIAP2, la survivine et XIAP. Ces protéines présentent toutes un motif peptidique particulier appelé le domaine « baculovirus IAP repeat » (BIR) en N-terminal qui peut être répété de 1 à 3 fois. Ces domaines BIR sont essentiels à la liaison des IAPs avec les caspases conduisant à l'inhibition de l'activité catalytique de ces dernières. De plus, certaines protéines possèdent en plus de leurs domaines BIR, un domaine protéique à doigt de zinc, « really interesting new gene » (RING), en C-terminal leur permettant d'agir comme des E3-ubiquitine ligase. Ce domaine RING va permettre l'induction de l'ubiquitination et la dégradation des caspases (174). Les IAPs sont capables d'inhiber à la fois l'activité des caspases initiatrices et celle des caspases effectrices mais chaque IAP possède des spécificités d'inhibition. Par exemple, XIAP qui est l'inhibiteur de caspase le plus puissant, est capable de se lier à la sous-unité p10 de la caspase 9 par son domaine BIR3 alors que c'est grâce à son domaine BIR2 qu'il pourra interagir avec les caspases 3 et 7.

Il existe d'autres inhibiteurs des caspases comme notamment les protéines FLIP (Fas-associated death domain-like ICE inhibitory proteins) qui sont des isoformes inactives de la caspase 8. Ces protéines FLIP possèdent 2 domaines DED, sont structurellement similaires à la partie N-terminale de la pro-caspase 8 mais elles ne possèdent pas de site catalytique actif. Ces protéines fonctionnent comme des molécules leurres en rentrant en compétition avec la pro-caspase 8 bloquant ainsi son recrutement au niveau du récepteur de mort.

De manière opposée, il existe des activateurs des caspases comme les calpaïnes qui jouent un rôle notamment dans l'apoptose induite par un stress du RE lors d'une perturbation de l'homéostasie calcique. En effet, les calpaïnes sont capables de cliver la pro-caspase 3 en caspase 3 active ainsi que de nombreux substrats communs aux caspases comme notamment la PARP. De plus, des inhibiteurs d'IAPs peuvent permettre une régulation positive de l'activité des caspases. C'est le cas notamment lors de la mise en place du processus apoptotique par voie mitochondriale où des activateurs comme Smac/Diablo ou Omi/HtrA2 vont être libérés dans le cytosol et inhiber l'action des IAPs.

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

La voie apoptotique extrinsèque est initiée par des perturbations au niveau de l'environnement extracellulaire et activée par la fixation de ligands pro-apoptotiques au niveau de la superfamille des récepteurs membranaires « tumor necrosis factor receptor » (TNFR). Parmi ces récepteurs on retrouve le récepteur au Fas-ligand dénommé Fas, les récepteurs au « tumor necrosis factor » (TNF) avec TNFR-1 et TNFR-2 et les récepteurs TRAIL avec DR4 et DR5. Ces récepteurs sont caractérisés par la présence d'un domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un domaine intracellulaire.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

L'interaction ligand/récepteur est favorisée grâce à la présence de domaines riches en cystéine « cysteine-rich domains » (CRD) au niveau du domaine extracellulaire du récepteur. Cette interaction va induire la trimérisation du récepteur pour permettre son activation. Ensuite au niveau de son domaine intracellulaire, le récepteur possède une région conservée présentant des domaines de mort (DD – death domain). Ces DD permettent le recrutement de protéines adaptatrices cytosoliques : les protéines FADD (Fas-associated death domain) ou TRADD (TNF receptor associated death domain). Ces protéines possèdent un domaine DD permettant la liaison au récepteur et un domaine DED capable d'interagir avec le domaine DED situé au niveau des pro-caspases initiatrices 8 et 10. La liaison des pro-caspases initiatrices permet la formation d'un complexe appelé « death inducing signaling complex » (DISC). Les pro-caspases initiatrices, de par leur rapprochement, vont alors être capables de s'autocliver pour s'activer. Les caspases 8 et 10 actives vont donc pouvoir ensuite permettre l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7 **(Figure 60)**.

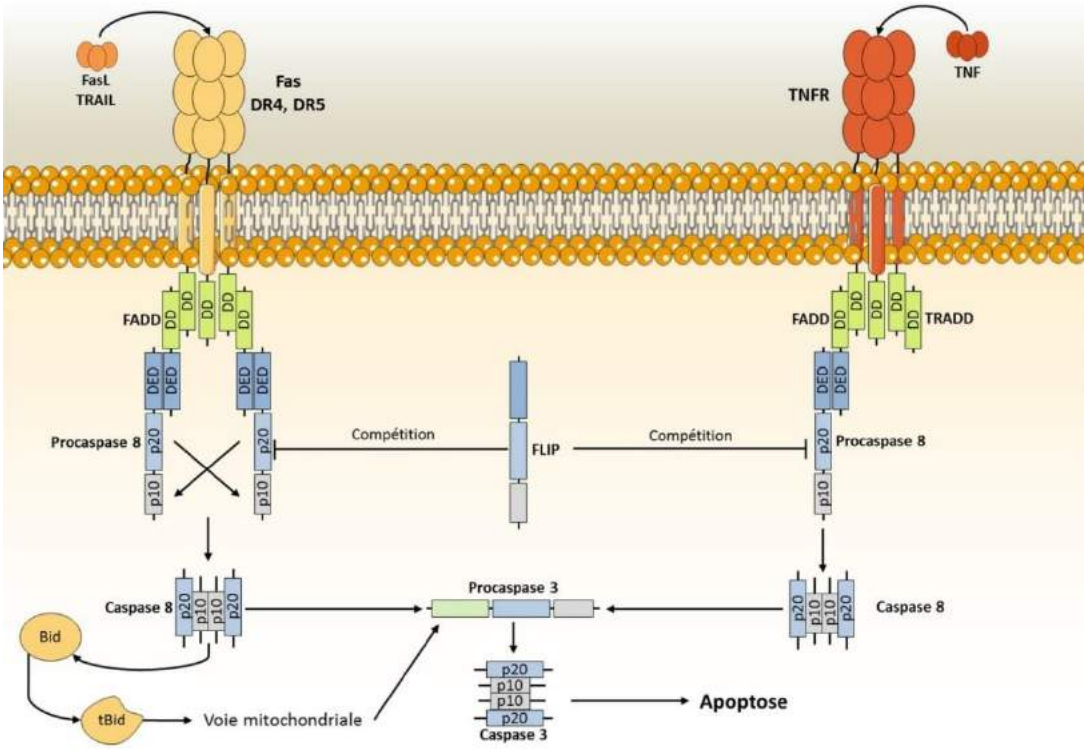


Figure 60 : voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort

Source : manuscrit de thèse Chloé Fidanzi-Dugas, 2016

C'est lors de la formation du complexe DISC que la voie extrinsèque est régulée. La régulation se fait grâce à la compétition engendrée par les protéines FLIP. La présence des 2 domaines DED sur les protéines FLIP leur permet de se fixer sur les domaines DED des protéines FADD ou TRADD, empêchant le recrutement des pro-caspases 8 au niveau du complexe DISC et donc inhibant la signalisation pro-apoptotique.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Très souvent en condition d'apoptose physiologique, le signal provenant des récepteurs activés n'est pas puissant pour déclencher la cascade d'activation des caspases. L'amplification du signal apoptotique est souvent engendrée par la protéine t-Bid qui permet l'activation de la voie intrinsèque ou voie mitochondriale.

IV.2.3. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque

La voie intrinsèque de l'apoptose est initiée par une grande variété de dommages subcellulaires subits par la cellule convergeant vers la mitochondrie. La mitochondrie est l'organite central dans le phénomène de mort cellulaire programmée. En effet, de par son implication dans divers processus physiologiques tels que la production d'énergie ou d'ERO, sa déstabilisation va engendrer la mort de la cellule.

IV.2.3.1. La mitochondrie, acteur clé de la voie intrinsèque

La mitochondrie est une organelle intracellulaire composée de 2 membranes, une membrane mitochondriale externe et une membrane mitochondriale interne qui délimitent 3 compartiments : le milieu extra-mitochondrial, l'espace intermembranaire mitochondrial et la matrice mitochondriale. La membrane interne, pour augmenter la surface d'échange, forme de nombreuses invaginations appelées crêtes mitochondriales. Les mitochondries sont présentes dans la majorité des cellules eucaryotes et leur nombre varie selon le type cellulaire et le besoin en énergie. Bien que leur taille et leur forme puissent évoluer selon l'activité de la cellule, leur structure reste inchangée.

La mitochondrie est une organelle essentielle puisque c'est en son sein qu'ont lieu plusieurs réactions comme le cycle de Krebs, la phosphorylation oxydative par la chaine respiratoire ou encore la β–oxydation des acides gras. En effet, les dernières étapes du cycle respiratoire qui permettent la conversion de l'énergie des molécules organiques issues de la digestion comme le glucose en ATP se réalisent au sein de la mitochondrie. L'activité de la chaîne respiratoire au niveau de la membrane interne de la mitochondrie engendre une accumulation de protons au niveau de l'espace intermembranaire. Cela a pour conséquence de créer un gradient de protons entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire qui définit un potentiel membranaire mitochondrial ($\Delta\Psi m$). Le retour des protons dans la matrice mitochondriale est uniquement possible au niveau de l'ATP synthase. Par l'échange d'une molécule d'ADP, l'ATP ainsi formé est ensuite transporté dans l'espace intermembranaire par l'adénine nucléotide translocase (ANT) puis il passe dans le cytosol au travers des canaux anioniques voltage-dépendants (VDAC) **(Figure 61)**.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

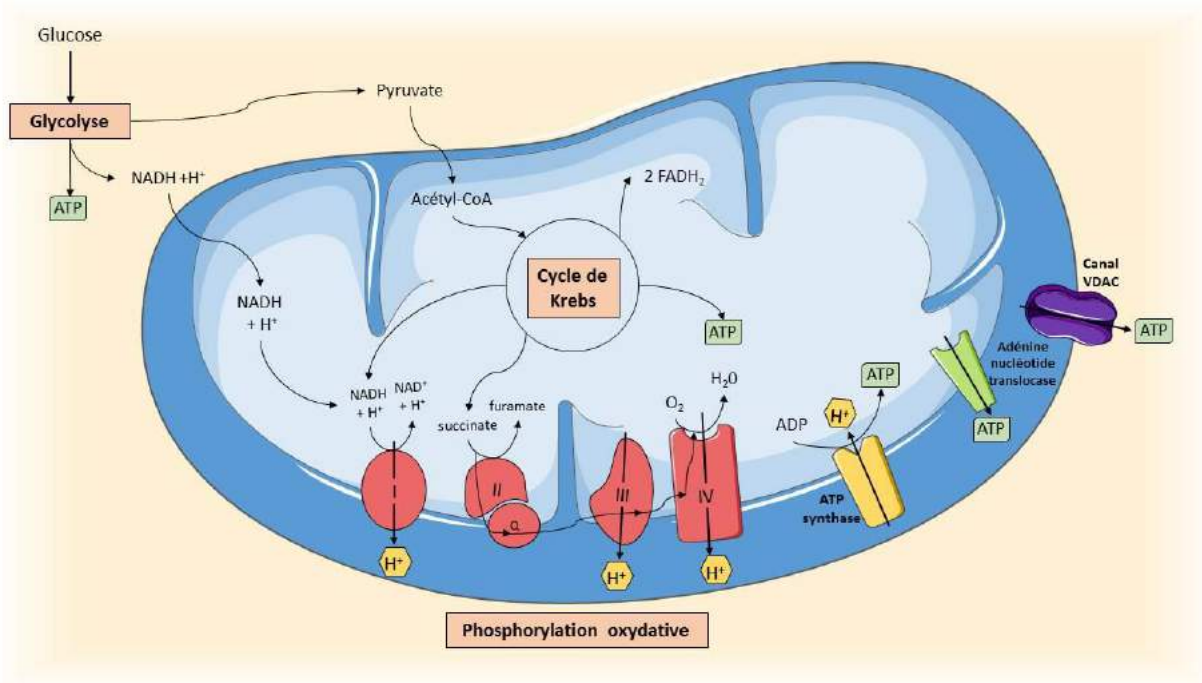


Figure 61 : rôle de la mitochondrie dans la production d'énergie

Source : manuscrit de thèse Chloé Fidanzi-Dugas, 2016

Depuis le milieu des années 90, il a été démontré que les mitochondries jouaient un rôle clé dans la voie apoptotique intrinsèque (175). Bien qu'une altération mitochondriale priverait la cellule d'énergie, la mitochondrie est directement impliquée dans l'intégration et la propagation des signaux de mort. La mise en place du processus de mort apoptotique est dépendante de la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie ainsi que la libération dans le cytoplasme de molécules solubles initialement séquestrées dans l'espace intermembranaire et permettant l'induction du processus apoptotique. Évidemment, ces 2 phénomènes sont extrêmement régulés par les protéines de la famille Bcl-2.

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

Les protéines de la famille Bcl-2 jouent un rôle crucial dans la régulation du processus apoptotique, certaines protéines peuvent favoriser l'apoptose alors que d'autres peuvent l'inhiber. Les protéines de cette famille sont caractérisées par la présence d'au moins un domaine BH (Bcl-2 homology) d'une vingtaine d'acides aminés. Il existe 4 domaines BH : BH1, BH2, BH3 et BH4. La présence de tel ou tel domaine a permis de classer cette famille de protéines en 3 catégories **(Figure 62)** :

- Les protéines anti-apoptotiques qui contiennent 3 à 4 domaines BH comme Mcl-1, Bcl-2, Bcl-X_L, Bcl-w et Bfl-1/A1. Le domaine BH4 est une région C-terminale hydrophobe qui permet l'ancrage à la membrane d'organites intracellulaires tels que la mitochondrie, le RE ou le noyau.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

- Les protéines pro-apoptotiques qui contiennent BH1, BH2, BH3 mais pas BH4 comme Bax et Bak.
- Les protéines « BH3-only » qui sont également des protéines pro-apoptotiques mais qui ne contiennent que le domaine BH3. Ce domaine BH3 est crucial dans l'interaction protéine-protéine et il est conservé chez toutes les protéines de la famille Bcl-2. Dans cette catégorie, on retrouve des protéines comme Bad, Bid, Bim, Bik, Noxa, Puma.

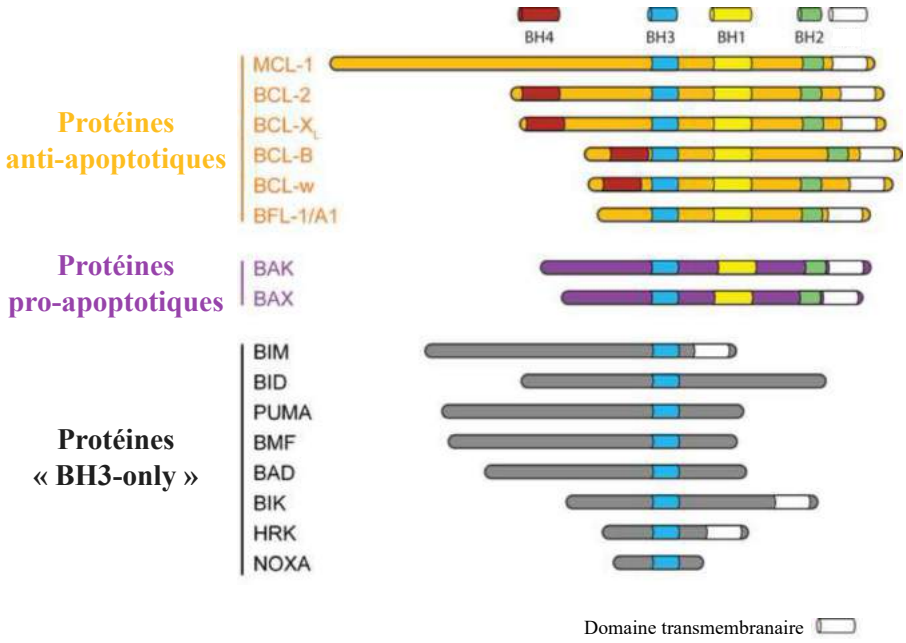


Figure 62 : les protéines de la famille Bcl-2

Source : adapté de Giménez-Cassina *et al.*, 2015 (176)

IV.2.3.3. La perméabilisation des membranes mitochondriales

La perméabilisation des membranes mitochondriales est considérée comme le point de non-retour du processus apoptotique. Elle est évidemment finement régulée par les protéines de la famille Bcl-2. En effet, les protéines pro-apoptotiques sont séquestrées par des protéines anti-apoptotiques sous forme monomérique inactive. Bax qui est située au niveau du cytoplasme est séquestrée par Bcl-2 ou Bcl-X_L et Bak qui est située au niveau de la membrane externe de la mitochondrie est séquestrée par Bcl-X_L ou Mcl-1. L'induction du processus apoptotique est déclenchée par les protéines BH3-only (177). Dans des conditions physiologiques normales, ces protéines sont très faiblement exprimées au niveau du cytoplasme. Cependant, selon le type de stimulus apoptotique, une protéine BH3-only va être activée et transloquée au niveau de la mitochondrie afin d'activer les protéines pro-apoptotiques et de neutraliser les protéines anti-apoptotiques. C'est le cas notamment de tBid qui permet l'activation directe de Bax et qui induit son insertion au niveau de la membrane externe de la mitochondrie.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Bak, quant à elle, est activée par la neutralisation des protéines qui la séquestre, c'est à dire la neutralisation de Bcl-X_L par Noxa et de Mcl-1 par Bad. Les protéines Bax et Bak ainsi libres peuvent s'oligomériser et former des pores MAC (mitochondrial apoptosis-induced channel) au niveau de la membrane externe de la mitochondrie. Ces MAC vont permettre la libération de protéines de l'espace intermembranaire de la mitochondrie, regroupées sous le nom de SIMPs (soluble inter membrane mitochondrial proteins) (178).

Cependant, ce mécanisme de perméabilisation mitochondriale reste controversé car d'autres modèles peuvent expliquer cette perméabilisation **(Figure 63)**. Il est admis que plusieurs phénomènes peuvent coopérer de façon simultanée ou séquentielle pour générer au final la libération des SIMPs. Cette perméabilisation est également possible grâce à l'ouverture d'un mégapore mitochondrial appelé PTPC (permeability transition pore complex) (179). Ce PTPC est un complexe multiprotéique composé notamment des canaux VDAC présents au niveau de la membrane mitochondriale externe et de l'ANT présente au niveau de la membrane mitochondriale interne. L'ouverture prolongée de ce PTPC induirait un gonflement de la matrice mitochondriale dû à l'hyperosmolarité de la matrice. Ce gonflement provoquerait un excédent de surface de la membrane interne par rapport à la membrane externe et donc une rupture mécanique de cette dernière libérant ainsi les SIMPs dans le cytosol. Enfin, il existe un 3ème modèle de perméabilisation mitochondriale induit par un dysfonctionnement de l'échange ATP mitochondrial/ADP cytosolique. La fermeture des canaux VDAC provoquerait l'absence d'échange ATP/ADP inhibant l'ATP synthase et donc le retour des protons vers la matrice. Cette hyperpolarisation de l'espace intermembranaire conduirait au gonflement de la matrice mitochondriale, à la rupture de la membrane externe de la mitochondrie et donc à la libération des SIMPs dans le cytosol (180).

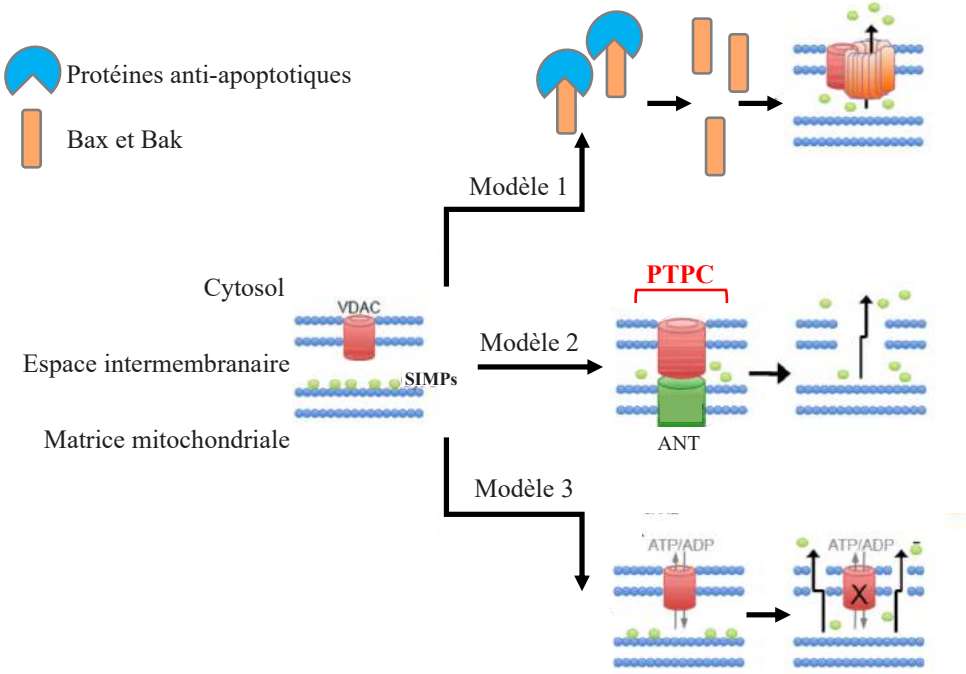


Figure 63 : les 3 modèles de perméabilisation mitochondriale

Source : adapté de McCommis *et al.*, 2013 (181)

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Les protéines ainsi libérées suite à la perméabilisation de la mitochondrie font partie de la famille des protéines SIMPs qui possèdent toutes une activité pro-apoptotique. Elles sont divisées en 2 classes. La première classe regroupe les SIMPs qui agissent sur la voie intrinsèque classique dépendante des caspases. Parmi cette classe, on retrouve essentiellement le cytochrome c, des pro-caspases et des répresseurs d'inhibiteur de caspases comme les protéines Smac/Diablo et Omi/HtrA2. La seconde classe regroupe les SIMPs agissant sur la voie intrinsèque de façon indépendante des caspases. On y retrouve les protéines AIF (apoptosis-inducing factor) et l'endonucléase G.

IV.2.3.4. La voie intrinsèque dépendante des caspases

Le cytochrome c est une petite hémoprotéine d'une centaine d'acides aminés liée à la cardiolipine qui joue un rôle au sein de la chaine respiratoire. Lors de l'apoptose, la peroxydation de la cardiolipine entraîne la libération du cytochrome c. À la suite de la perméabilisation mitochondriale et de la libération du cytochrome c dans le cytoplasme, il est capable d'interagir en présence d'ATP avec Apaf-1 (apoptosis protease-activating factor-1). Cette interaction entraîne la modification de la conformation d'Apaf-1 et favorise l'oligomérisation en 7 molécules d'Apaf-1. La présence d'un domaine CARD sur Apaf-1 permet le recrutement de la pro-caspase 9. Ces pro-caspases 9 se retrouvent ainsi suffisamment proches pour s'auto-activer. Ce complexe protéique formé d'un heptamère de cytochrome c/ATP/Apaf-1/caspases 9 actives est appelé apoptosome (182). Lorsqu'il est actif, l'apoptosome est capable de recruter et d'activer les caspases effectrices 3 et 7 conduisant à terme à la mort cellulaire **(Figure 64)**. Cependant, comme ce processus est finement régulé, les IAPs par l'intermédiaire de leurs domaines BIR sont capables de bloquer la maturation des caspases. C'est pour cela que d'autres SIMPs sont libérées lors de la perméabilisation mitochondriale comme Smac/Diablo et Omi/HtrA2 qui sont capables d'antagoniser les IAPs par liaison au niveau des domaines BIR des IAPs.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

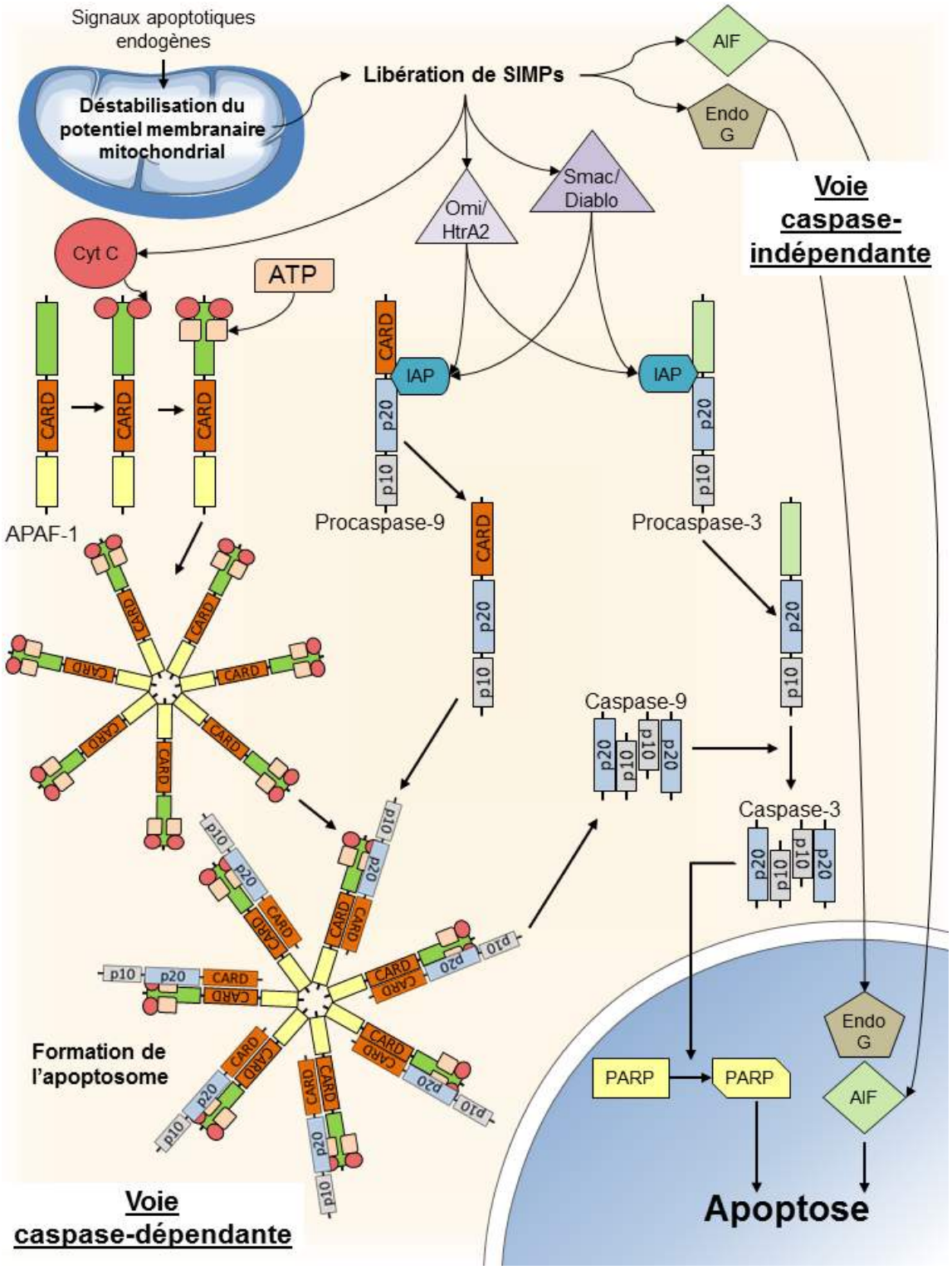


Figure 64 : voie intrinsèque ou voie mitochondriale

Source : manuscrit de thèse Chloé Fidanzi-Dugas, 2016

Licence CC BY-NC-ND 3.0

IV.2.3.5. La voie intrinsèque indépendante des caspases

La voie intrinsèque indépendante des caspases est mise en jeu grâce à la seconde classe des SIMPs libérées lors de la perméabilisation mitochondriale, l'AIF et l'endonucléase G. Ces 2 SIMPs sont localisées au niveau de l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Après leur libération dans le cytosol, l'AIF et l'endonucléase G sont capables de se transloquer vers le noyau. Elles sont capables d'induire une condensation de la chromatine et un clivage de l'ADN de manière totalement indépendante des caspases **(Figure 64)** (183,184).

IV.3. L'apoptose et la thérapie photodynamique anticancéreuse

La perturbation de l'équilibre délicat entre prolifération et mort cellulaire peut conduire à certaines pathologies, notamment le cancer. En effet, il a été démontré que les cellules cancéreuses échappent au phénomène apoptotique leur permettant une croissance incontrôlée. Cet échappement est notamment dû à des altérations des protéines impliquées dans la signalisation de la mort cellulaire rendant ces cellules plus résistantes aux traitements dont l'action principale est d'induire l'apoptose. L'apoptose induite par la PDT a été très largement étudiée (185,186). Du fait du faible rayon d'action de l'oxygène singulet produit lors de la PDT, l'apoptose est essentiellement initiée au niveau des sites de localisation des PS. Les PS s'accumulant préférentiellement au niveau des organelles telles que la mitochondrie, le RE et les lysosomes, la voie prédominante de mort cellulaire induite par PDT est la voie intrinsèque.

La perméabilisation mitochondriale induite par l'ouverture prolongée du PTPC a été mise en évidence lors de traitements par PDT. La PpIX possède une haute affinité pour les récepteurs périphériques des benzodiazépines au niveau de la membrane externe de la mitochondrie proche du PTPC. Il a été montré que la photo-oxydation de l'héxaminolévulinate, un précurseur de la PpIX, entraînait l'ouverture du PTPC dans les cellules leucémiques humaines Reh. L'utilisation d'un agent inhibiteur de l'unité ANT du PTPC, l'acide bongkrekique, supprime la dépolarisation induite par la PDT (187). C'est également le cas lors de l'utilisation d'autres inhibiteurs du PTPC comme la cyclosporine A et la trifluoroperazine qui restaurent le $\Delta\Psi m$ à la suite d'un traitement à la phtalocyanine 4 (Pc 4) par PDT (188). L'implication de la perméabilisation mitochondriale à travers le PTPC dans le cadre de la PDT a été démontrée mais uniquement pour les PS se localisant au niveau mitochondrial. En effet, l'utilisation de ces inhibiteurs du PTPC ne permet pas de restaurer le $\Delta\Psi m$ lors de l'utilisation de PS comme l'hypéricine préférentiellement localisée au sein du RE et des lysosomes (189) ou du Foscan® préférentiellement localisé au niveau du RE et de l'appareil de Golgi (190).

La perméabilisation mitochondriale induite *via* Bax a également été mise en évidence lors de traitements par PDT. En effet, il a été démontré que la photoactivation de la Pc 4 dans des cellules de cancer du sein humain MCF-7c3 entraînait la translocation de Bax du cytosol vers la mitochondrie ainsi que le relargage du cytochrome c. L'inhibition de l'expression de Bax entraîne une diminution importante de l'apoptose induite par la Pc 4 démontrant l'intérêt principal de Bax dans l'induction de l'apoptose. Cela a été confirmé par la restauration de l'expression de Bax sur les cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

En effet, ces cellules sont déficientes pour Bax et ne présentent aucun signe d'apoptose induit par la photoactivation de Pc 4. En revanche, lors de la restauration de l'expression de Bax, ces cellules deviennent sensibles au traitement de la Pc 4 par PDT (191).

L'activation de Bax étant dépendante des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, notamment par Bcl-2 ou Bcl-X_L, le ratio Bax/Bcl-2 est déterminant dans l'entrée des cellules en apoptose. L'augmentation de l'expression de Bax concomitante à la diminution de l'expression de Bcl-2 a été démontrée lors de la PDT. En effet, dans des lignées de cancer du sein, l'hypéricine inhibe l'expression de Bcl-2 ou Bcl-X_L et augmente l'expression de Bax après PDT (192,193). L'augmentation de la quantité de Bax active est également possible par l'utilisation de PS qui sont à l'origine de photo-dommages des protéines Bcl-2 ou Bcl-X_L. En effet, la photoactivation de la Pc 4 dans des cellules cancéreuses prostatiques humaines DU 145 et LNCaP induit une inhibition de l'expression de Bcl-2 endogène tout comme lors d'une surexpression induite (194). La diminution des protéines anti-apoptotiques favorise l'activation de Bax et donc la mise en place du processus apoptotique par la voie intrinsèque.

L'apoptose dans le cadre de la PDT à visée anticancéreuse est majoritairement induite par sa voie intrinsèque. Cependant, le processus apoptotique est soumis à de nombreuses régulations pouvant engendrer des mécanismes de résistance. Ces résistances sont souvent responsables de l'inefficacité de certaines thérapies anticancéreuses soulignant l'intérêt grandissant des thérapies combinées.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Chapitre V. L'autophagie

Le terme autophagie a été proposé en 1963 par le Dr. Christian de Duve lorsqu'il a découvert un processus catabolique par lequel la cellule est capable de recycler son matériel cytoplasmique. En effet, le terme autophagie vient du grec, auto (soi-même) et phagie (manger), qui signifie se manger soi-même. Cependant, ce n'est que dans les années 90 que les recherches se sont décuplées sous l'impulsion du Pr. Yoshinori Oshumi. Il a d'ailleurs été récompensé par le prix Nobel de médecine en 2016 pour ses découvertes sur les mécanismes moléculaires de l'autophagie chez la levure et sur l'existence de ces mêmes mécanismes chez l'Homme. L'autophagie conduit à la dégradation des organites et des macromolécules cellulaires par l'intermédiaire du lysosome. Les produits de dégradation vont ensuite être recyclés comme source d'énergie pour la cellule afin de permettre la synthèse de nouvelles macromolécules. L'autophagie est mise en place suite à un stress cellulaire afin de maintenir l'homéostasie cellulaire.

V.1. Les différentes formes d'autophagie

L'autophagie est composée de différentes formes : la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes, l'ADN/ARN autophagie et la macro-autophagie **(Figure 65)**.

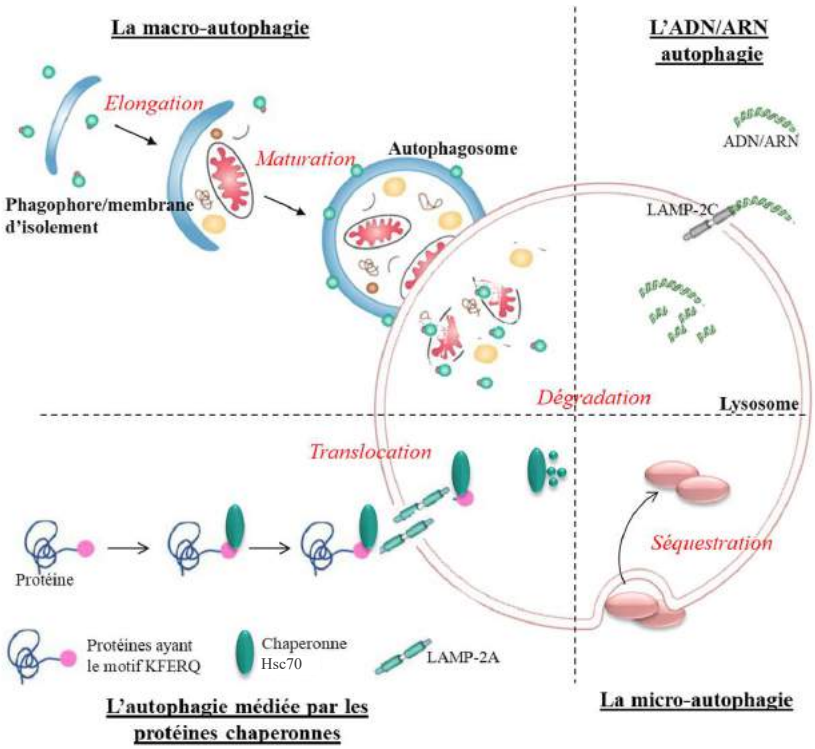


Figure 65 : les différentes formes d'autophagie

Source : manuscrit de thèse Cécily Lucas, 2018

Licence CC BY-NC-ND 3.0

V.1.1. La micro-autophagie

La micro-autophagie est un processus non sélectif qui peut être activé de manière constitutive ou à la suite d'un stress cellulaire afin de dégrader des organites endommagés. La micro-autophagie est caractérisée par une invagination de la membrane lysosomale permettant la séquestration du contenu cytoplasmique qui sera ensuite dégradé (195). La micro-autophagie est peu étudiée chez les mammifères et ses mécanismes moléculaires sont mal décrits. Cependant, chez la levure, elle possède 3 cibles privilégiées : les peroxysomes avec la micro-pexophagie, les portions du noyau avec la micro-autophagie « piecemeal » et les mitochondries avec la micro-mitophagie.

V.1.2. L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes

L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes est un type d'autophagie décrit uniquement chez les cellules eucaryotes et qui est exclusivement sélective. Contrairement à la micro-autophagie, l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes repose sur la translocation des protéines à dégrader au travers de la membrane lysosomale et non sur une invagination. Ce mécanisme d'autophagie concerne exclusivement les macromolécules possédant un motif pentapeptidique KFERQ (Lysine-Phénylalanine-Acide Glutamique-Arginine-Glutamine), soit environ 30% des protéines solubles cytosoliques et nucléaires. Ce motif est reconnu de façon spécifique par la protéine chaperonne Hsc70 (heat shock cognate 70 protein) ce qui permet la formation d'un complexe alors adressé à la membrane lysosomale. L'internalisation de ce complexe est dépendante de la protéine transmembranaire LAMP-2A (lysosomal-associated membrane protein 2A). Sous sa forme monomérique, elle joue le rôle de récepteur alors que sous sa forme multimérique elle permet la translocation du complexe dans le lysosome où il sera ensuite dégradé (196).

V.1.3. L'ADN/ARN autophagie

L'ADN/ARN autophagie n'est décrite que depuis 2013 par le Dr. Yuuki Fujiwara. C'est un processus ATP dépendant qui permet la reconnaissance spécifique d'acides nucléiques présents dans le cytoplasme. Cette voie d'autophagie est caractérisée par l'interaction directe des acides nucléiques avec la protéine de la membrane lysosomale LAMP-2C. Cette interaction qui ne nécessite pas l'intervention de protéine chaperonne permet le passage des acides nucléiques dans le lysosome au sein duquel ils seront dégradés par des endonucléases et exonucléases spécifiques (197,198).

V.1.4. La macro-autophagie

La macro-autophagie est la forme la plus étudiée dans la littérature et très souvent nommée autophagie. L'autophagie est considérée comme une voie de dégradation massive qui permet le maintien de l'homéostasie cellulaire en recyclant le contenu cytoplasmique.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

En effet, l'autophagie est capable de dégrader un nombre important de substrats grâce à la séquestration du contenu cytoplasmique dans une vacuole à double membrane appelée autophagosome. L'autophagie est présente en condition physiologique mais elle est stimulée en réponse à un stress cellulaire comme des carences en facteurs de croissance ou en acides aminés, l'hypoxie ou un stress oxydatif ou encore lors d'infections. Cette voie ubiquitaire est très conservée chez les eucaryotes. Elle est finement régulée par une trentaine de gènes appelés les gènes *ATG* (autophagy related genes). Ces derniers contrôlent les différentes étapes de mise en place de l'autophagie, c'est à dire l'initiation puis l'élongation et la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (199).

V.2. Les étapes de la macro-autophagie

V.2.1. L'initiation

L'étape d'initiation de l'autophagie se caractérise par la formation d'une structure membranaire appelée phagophore. L'origine des membranes du phagophore n'est pas encore bien élucidée puisque différentes études lui attribuent des origines différentes. Il semblerait que le phagophore prendrait origine au niveau de la membrane du RE mais des études divergentes ont montré qu'il pouvait prendre origine au niveau de la membrane nucléaire, de la mitochondrie ou encore de la membrane plasmique (200).

L'initiation de l'autophagie requiert un grand nombre d'acteurs regroupés en 3 complexes et qui interagissent entre eux afin de former le phagophore (201) :

- Le complexe mTORC1 (mechanistic target of rapamycin complex 1) qui est constitué de la kinase mTOR (mechanistic target of rapamycin), de Raptor (regulatory-associated protein of mTOR), de Deptor (DEP domain-containing mTOR-interacting protein), de mLST8 (mTOR associated protein LTS8 homolog) et de PRAS40 (proline-rich Akt substrate of 40 kDa).
- Le complexe ULK (Unc-51-like kinase) qui est formé des protéines ULK1/2, Atg13, Atg101 et FIP200 (focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa).
- Le complexe PI3K (phosphoinositide 3-kinase) de classe III qui est composé d'Atg14, de Bécline-1, de p150, de VPS34 (vacuolar protein sorting 34) et d'Ambra-1 (activating molecule in beclin-1-regulated autophagy protein 1).

Dans les conditions normales, le complexe mTORC1 agit comme un inhibiteur de l'autophagie. En effet, le complexe mTORC1 interagit avec le complexe ULK en phosphorylant les protéines ULK1/2 et Atg13. L'interaction entre FIP200 et ULK1/2 étant médiée par Atg13, sa phosphorylation l'empêche de remplir son rôle ce qui conduit à une diminution de l'activité kinase d'ULK1/2. En condition de stress cellulaire, le complexe mTORC1 est inhibé et son interaction avec le complexe ULK n'est plus possible. Cela a donc pour conséquence de permettre aux protéines kinases ULK1/2 de phosphoryler la protéine Ambra-1 du complexe PI3K qui permet l'interaction d'Ambra-1 avec Bécline-1.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

De plus, ULK1/2 est capable de phosphoryler directement Bécline-1 afin d'augmenter son activité. Une fois en place, Bécline-1 va phosphoryler VPS34 afin d'induire la formation de PI3P (phosphatidylinositol-3-phosphate) sur la membrane du phagophore **(Figure 66)**. PI3P est une molécule lipidique capable de contrôler la formation de l'autophagosome en recrutant des protéines nécessaires à l'élongation du phagophore.

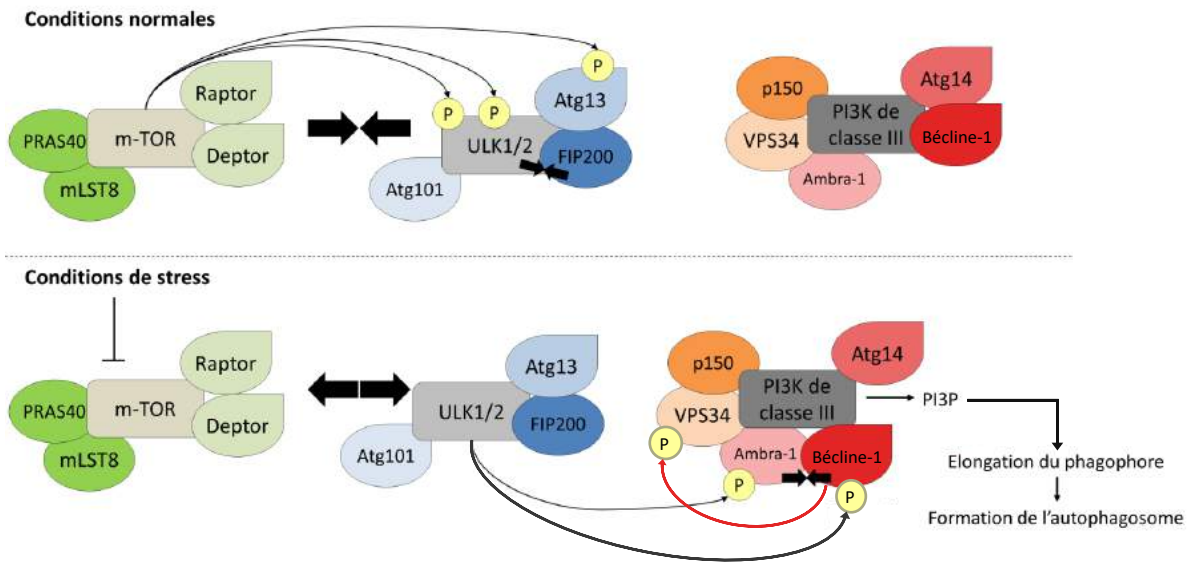


Figure 66 : l'initiation de l'autophagie

Source : adapté du manuscrit de thèse Chloé Fidanzi-Dugas, 2016

V.2.2. L'élongation

Lorsque le phagophore est généré, il est nécessaire qu'il s'allonge afin qu'il puisse s'incurver autour du contenu cytoplasmique à séquestrer formant ainsi une vacuole à double membrane appelée autophagosome. Cette étape d'élongation est régulée par deux complexes de conjugaison analogues aux systèmes d'ubiquitinylation des protéines appelés « ubiquitin-like conjugaison system ». Ces systèmes sont constitués de 3 classes de protéines : les enzymes activatrices E1, de conjugaison E2 et d'ubiquitine ligases E3. L'action de l'enzyme E3 va permettre la liaison d'un résidu glycine de l'ubiquitine à un résidu lysine d'une protéine. L'élongation est donc contrôlée par un hétéro-trimère composé d'Atg12-Atg5-Atg16L1 et d'un second complexe impliquant la protéine LC3-PE (light chain 3 - phosphatidyléthanolamine) **(Figure 67)**.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

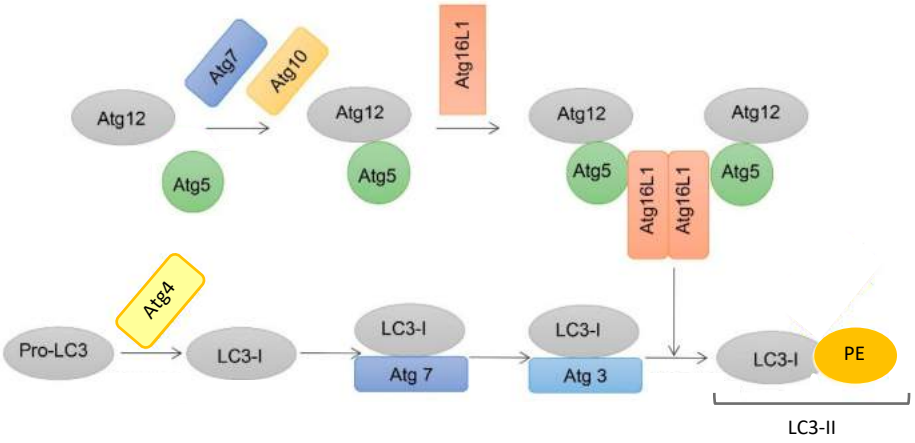


Figure 67 : les 2 modes d'élongation du phagophore

Source : adapté de Fu *et al.*, 2019 (202)

V.2.2.1. Le complexe d'élongation Atg12-Atg5-Atg16L1

Dans ce premier mode d'élongation, Atg12 présente un résidu glycine en C-terminal ce qui lui permet d'être directement activée par l'activité de l'enzyme E1, Atg7. Cette activation, ATP-dépendante entraîne le transfert d'Atg12 vers l'enzyme de conjugaison E2, Atg10. Enfin, Atg12 se lie de façon covalente, grâce à sa glycine en C-terminal, à la lysine 149 de la protéine Atg5 libérant ainsi l'Atg10. Aucune ligase E3 ne semble intervenir dans ce mode d'élongation. La protéine Atg16L1 va ensuite s'associer de façon non covalente afin de former le complexe Atg12-Atg5-Atg16L1 situé sur la membrane externe du phagophore en élongation.

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

Dans ce second mode d'élongation, la protéine LC3 est présente sous forme immature appelée pro-LC3. De par la présence d'une glycine en C-terminal, la pro-LC3 va être clivée par la protéinase Atg4, induisant ainsi la création de sa forme cytosolique active LC3-I. Ce clivage engendre l'exposition d'un résidu glycine 116 en C-terminal de LC3-I permettant son activation par Atg7. Cette activation, ATP-dépendante, entraîne le transfert de LC3-I vers la protéine Atg3 libérant ainsi l'Atg7. Ensuite, la glycine 116 en C-terminal va se lier à un phospholipide membranaire, la PE donnant naissance au conjugué LC3-PE ou LC3-II. LC3-II contrairement au complexe Atg12-Atg5-Atg16L1 se distribue au niveau des membranes externes mais aussi internes du phagophore.

Ce complexe est primordial dans les dernières étapes de la formation du phagophore fermé ou autophagosome. En effet, contrairement au complexe Atg12-Atg5-Atg16L1, le complexe LC3-II ne se dissocie pas après la formation complète de l'autophagosome.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Le complexe LC3-II situé au niveau de la surface interne de l'autophagosome ne sera dégradé que lors de sa fusion avec les lysosomes. Ces caractéristiques font de LC3-II un marqueur de choix pour l'étude de l'autophagie (203).

Il existe une interdépendance entre ces 2 complexes puisque l'absence d'Atg5 ne permet pas la formation du complexe LC3-II et réciproquement la quantité du complexe LC3-II régule la formation du complexe Atg12-Atg5-Atg16L1 (204,205).

V.2.3. La maturation et la fusion de l'autophagosome avec le lysosome

L'élongation des extrémités du phagophore permet la fermeture de la double membrane afin de former l'autophagosome d'une taille comprise entre 0,5 et 1,5 µm. La maturation de l'autophagosome nécessite l'activité d'Atg4 afin de dissocier les complexes LC3-II de la surface externe de l'autophagosome. En effet, sans l'action de l'Atg4, des autophagosomes incomplets et non fermés s'accumulent dans la cellule bloquant le processus autophagique (206). Lorsque les autophagosomes sont matures, ils fusionnent avec des endosomes afin de former des amphisomes grâce aux protéines de la machinerie ESCRT (endosomal sorting complex required for transport). Ensuite, les amphisomes peuvent fusionner avec les lysosomes grâce à l'intervention de la machinerie Rab-SNARE (soluble N-ethylmaleimide sensitive factor attachment protein receptor) afin de former l'autophagolysosome ou autolysosome **(Figure 68)**.

La dernière étape de l'autophagie est la dégradation du contenu de l'autolysosome. Cette étape nécessite la participation des hydrolases acides du lysosome telles que les lipases qui génèrent des acides gras à partir des lipides, les protéases qui dégradent les protéines en peptides qui seront ensuite dégradés en acides aminés par des peptidases ou encore des nucléases qui dégradent les acides nucléiques en nucléosides. L'ensemble de ces produits de dégradation vont ensuite être libérés dans le cytosol par des transporteurs lysosomaux afin de permettre leur réutilisation par la cellule.

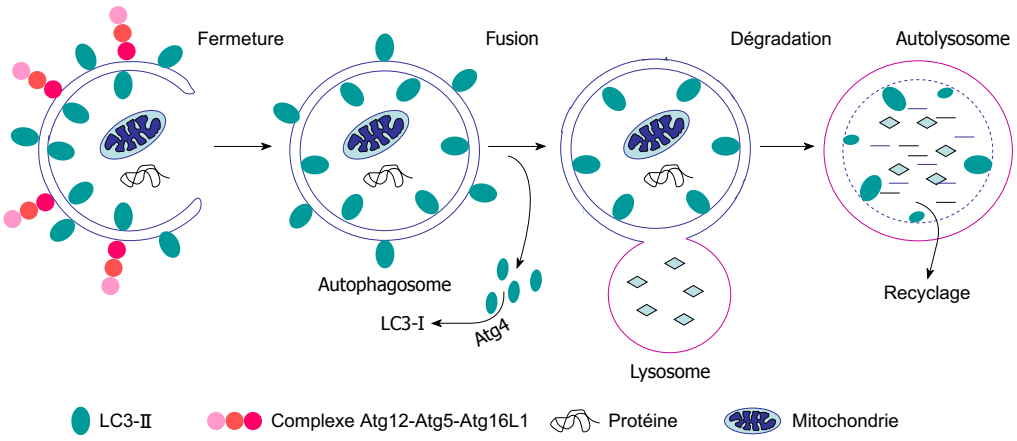


Figure 68 : l'étape de maturation et de fusion de l'autophagosome avec le lysosome

Source : adapté de Abounit *et al.*, 2012 (207)

Licence CC BY-NC-ND 3.0

V.3. Le rôle paradoxal de l'autophagie dans les cancers

Des dérégulations de l'autophagie sont régulièrement associées à différentes pathologies telles que les maladies neurodégénératives, l'infection par des pathogènes, les maladies inflammatoires chroniques, le vieillissement ou encore les cancers (208). En effet, il a été démontré une diminution de l'activité autophagique globale plus l'individu est âgé (209). Cette dérégulation est inversement corrélée avec l'apparition de pathologies comme le CCR qui est un cancer dont l'un des premiers facteurs de risque est l'âge. De nombreux travaux ont permis d'illustrer un lien étroit entre régulation de l'autophagie et la carcinogenèse (210). Cependant, le rôle de l'autophagie dans le processus tumoral est paradoxal puisqu'il peut très bien être pro- ou anti-tumoral selon le contexte cellulaire.

V.3.1. L'autophagie, un suppresseur oncogénique

Dans les conditions physiologiques normales, l'autophagie a pour rôle de maintenir l'intégrité cellulaire en éliminant les évènements qui pourraient être délétères pour la cellule. Elle permet notamment de prévenir la transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse en maintenant l'intégrité génomique de la cellule. En effet, l'autophagie permet d'éliminer l'accumulation de dommages à l'ADN, souvent retrouvés dans l'initiation tumorale, induite lors d'un stress métabolique notamment associé à une hyperproduction d'ERO. Ce rôle protecteur de l'intégrité génomique a été démontré lors de la délétion d'Atg5 dans les cellules iBMK (211). En effet, la déficience en autophagie par la délétion d'Atg5 entraîne une augmentation du taux de mutation, une instabilité chromosomique, une activation importante de la réponse aux dommages à l'ADN et une aneuploïdie importante, marqueurs incontestables de la tumorigenèse. De plus, il a été montré sur des souris déficientes pour les gènes *Atg5* et *Atg7* au niveau du foie qu'elles développaient des adénomes hépatiques précoces liés à une accumulation de mitochondries endommagées, d'ERO et de dommages à l'ADN (212). Le rôle suppresseur oncogénique de l'autophagie a été confirmé lors d'un traitement par la diéthylnitrosamine, un agent carcinogène. En effet, l'autophagie est activée à la suite du traitement afin d'inhiber les dommages à l'ADN et l'instabilité génomique induits par l'agent chimique (213).

L'autophagie peut également permettre le ralentissement de la progression tumorale (214). En effet, la mise en place d'un stress hypoxique et métabolique lors de l'initiation précoce de la tumorigenèse peut conduire à l'apparition de signaux nécrotiques. La nécrose, caractérisée par une lyse cellulaire massive, induit une inflammation au niveau tumoral. Cette inflammation permet le recrutement de macrophages sécrétant des cytokines qui favorisent la croissance cellulaire pour remplacer les tissus endommagés. En réponse à ces agressions, l'autophagie est activée afin de diminuer la nécrose et donc l'inflammation diminuant ainsi l'hyper-prolifération des cellules cancéreuses.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

V.3.2. L'autophagie, un acteur pro-tumoral

L'autophagie peut également être un acteur pro-tumoral puisqu'elle permet de répondre aux forts besoins métaboliques des cellules cancéreuses en constante prolifération. En effet, il a été démontré une forte activation de l'autophagie dans certains cancers permettant la dégradation et le recyclage de nombreux composés augmentant les ressources métaboliques disponibles pour les cellules cancéreuses (215). L'inhibition de l'autophagie dans ces cancers apparaît donc comme une cible thérapeutique de choix afin de potentialiser l'effet des traitements anticancéreux. Effectivement, l'inhibition de l'autophagie par la 3-MA (3-méthyladénine), un inhibiteur du complexe PI3K de classe III, permet d'amplifier l'effet anticancéreux du 5-FU sur les cellules de CCR colon26 et HT-29 (216). Il a également été mis en évidence qu'une délétion du gène *Atg7* ou du gène *FIP200* entraîne respectivement une régression tumorale des cancers du poumon ou des cancers mammaires (217,218).

De plus, il a été montré une augmentation de l'autophagie dans les métastases. En effet, une augmentation de LC3-II a été mise en évidence dans les métastases de mélanome par rapport à la tumeur primaire (219). Dans les cas de glioblastomes, l'augmentation de l'autophagie est même associée à un phénotype plus invasif et plus agressif (220). En effet, au niveau des métastases, l'autophagie induit la résistance à l'anoïkis, c'est à dire au maintien de la survie des cellules malgré leur détachement de l'épithélium (221).

L'ensemble de ces données illustrent clairement le rôle paradoxal de l'autophagie dans les cancers. Ce paradoxe est également souligné par l'utilisation en clinique de molécules approuvées par la FDA comme l'évérolimus ou encore au stade d'essai clinique de modulateurs de l'autophagie, activateurs ou inhibiteurs, dans les traitements anticancéreux (222).

V.4. L'autophagie et la thérapie photodynamique anticancéreuse

Aujourd'hui, le rôle exact de l'autophagie lors de traitements anticancéreux par PDT reste incertain (223). En général dans le cadre de la PDT, l'autophagie est activée en réponse à la production d'ERO qui endommagent les organelles (224). L'autophagie joue un rôle concomitant à l'apoptose induite par la PDT mais son activité est dépendante du type cellulaire, de la localisation du PS ainsi que de la quantité d'ERO produite. En effet, la localisation du PS semble être un point clé du rôle de l'autophagie dans la PDT anticancéreuse du fait du faible rayonnement des ERO produites. Il a été démontré que les PS localisés au niveau du RE ou la mitochondrie induisent une autophagie inductrice de survie cellulaire par recyclage des organites endommagés alors que les PS localisés au niveau des lysosomes ne permettent pas l'induction du processus autophagique de fait du blocage de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome.

Lors des traitements par PDT, l'autophagie joue souvent un rôle de résistance à l'apoptose. En effet, l'utilisation de la chlorophylline f comme PS induit l'apoptose et l'autophagie dans des lignées de cancer de la vessie (225). Une inhibition de l'autophagie par la 3-MA permet de potentialiser l'effet anticancéreux de la PDT.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Ce phénomène de résistance induite par l'autophagie a été rapporté dans plusieurs études. C'est le cas notamment lors de l'utilisation de l'aloé-émodine sur des cellules d'ostéosarcome humain MG-63 dont l'effet anticancéreux est décuplé lors de l'utilisation d'inhibiteur de l'autophagie comme la 3-MA ou la chloroquine (226). Il en est de même sur des cellules de CCR humain SW620 traitées par la chlorine e6 (Ce6) où l'effet de la PDT est potentialisé par l'utilisation d'inhibiteurs tels que la 3-MA ou la bafilomycine A1 (227). De plus, des PS comme la PpIX sont capables d'augmenter l'expression des protéines de l'autophagie comme Atg3, Atg5, Atg7 et Atg12. L'inhibition de ces protéines par des inhibiteurs pharmacologiques ou par silencing permet de décupler l'effet anticancéreux de la PpIX et de mettre en lumière le rôle protecteur de l'autophagie vis-à-vis de l'apoptose (228). Il a également été démontré que certains PS peuvent induire des photo-dommages sur de nombreuses protéines régulatrices de l'autophagie sans pour autant inhiber la formation d'autophagosomes (229).

En revanche, il a été démontré que certains PS ciblant préférentiellement les lysosomes pouvaient inhiber l'induction de l'autophagie. En effet, l'utilisation en PDT de la Npe6 et du palladium WST11 permet d'induire des photo-dommages aux lysosomes inhibant ainsi le processus autophagique (230). L'utilisation de la Npe6 en PDT n'inhibe pas la formation d'autophagosomes mais, en absence de lysosome viable, les autophagosomes s'accumulent dans la cellule et le processus autophagique ne peut pas être complété (231).

Dans le cadre de la PDT anticancéreuse, de par son rôle de résistance à l'apoptose, l'autophagie semble être une cible de choix afin de décupler l'efficacité anticancéreuse des PS. La combinaison de molécules pro-apoptotiques et anti-autophagiques associée aux bénéfices de la PDT et des nanoparticules pourrait être une voie de recherche très intéressante pour le développement des futures thérapies anticancéreuses.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Projet de recherche

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Actuellement, le CCR est l'un des cancers les plus diagnostiqués dans le monde tous sexes confondus et surtout le 2ème cancer le plus mortel. Depuis la 2ème moitié du XXème siècle, la recherche a permis de développer des traitements plutôt très efficaces contre le CCR notamment avec les chimiothérapies, les radiothérapies et les thérapies ciblées en complément de la chirurgie. Cependant, malgré l'intérêt conséquent de ces traitements anticancéreux, de nombreux effets secondaires subsistent chez les patients qui, de plus, développent depuis quelques années de nombreuses résistances aux traitements conventionnels. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses est donc nécessaire afin d'améliorer la prise en charge de ces patients. Depuis maintenant plusieurs décennies, la thérapie laser pour le traitement focal des cancers comme la PDT tente de se développer. Même si elle est autorisée en clinique pour le traitement de certains cancers notamment pour les cancers dermatologiques, en ce qui concerne le CCR, elle reste encore au stade d'innovation thérapeutique. La PDT se présente comme une stratégie thérapeutique limitant fortement les effets secondaires indésirables des traitements conventionnels par l'utilisation de PS non cytotoxiques en l'absence de photoactivation. À l'inverse, une fois activés par la lumière, ils seront capables d'induire des réactions chimiques oxydatives conduisant à la destruction de la tumeur. De plus, la PDT par la diversité des PS, se présente également comme une nouvelle piste pour les nombreux cas de récidive ou de résistance aux chimiothérapies actuelles. L'un des problèmes majeurs des traitements conventionnels comme la chimiothérapie mais également de la PDT est le mauvais ciblage des traitements envers les cellules tumorales. La nanomédecine, par l'utilisation de nanoparticules, permet un ciblage préférentiel des sites tumoraux grâce à l'effet EPR. De plus, la PDT utilisant des PS très hydrophobes, la biodistribution de ces derniers est très compliquée dans les milieux physiologiques. La vectorisation des PS grâce à la nanomédecine va permettre d'améliorer leur biodistribution. L'objectif de ce projet de thèse a donc été d'étudier l'intérêt de la combinaison de la PDT avec la nanomédecine afin de mieux traiter les CCR. Dans cette étude, le PS utilisé est la 5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (TPPOH). La TPPOH libre a ensuite été conjuguée avec le xylane afin de limiter l'opsonisation hépatique formant la TPPOH-xylane (TPPOH-X). La TPPOH-X a ensuite été greffée sur des nanoparticules de silice (SNPs) de 80 nm afin de former les nanoparticules de silice recouvertes de la TPPOH-xylane (TPPOH-X SNPs).

Le but de ces travaux de recherche a été d'évaluer à la fois *in vitro* et *in vivo* l'effet de ce nouveau PS nanovectorisé. Tout d'abord, l'objectif a été de déterminer l'efficacité anticancéreuse par PDT avec la TPPOH libre et par combinaison PDT-nanomédecine avec les TPPOH-X SNPs *in vitro* sur 3 lignées cellulaires de CCR humain. Ensuite, puisque la nanomédecine permet d'améliorer la biodistribution des PS, la stratégie a été d'analyser si les TPPOH-X SNPs possédaient une plus forte capacité à pénétrer dans les cellules par rapport à la TPPOH libre. Par la suite, la démarche a été de comprendre par quel processus de mort cellulaire les TPPOH-X SNPs entraînaient leur effet anticancéreux. Enfin et pour valider les résultats obtenus, l'objectif a été d'étudier *in vivo* l'effet de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur le développement de tumeurs de CCR humain induites par xénogreffes sous-cutanées sur des souris immunodéficientes. De plus, de par l'importance de la nanomédecine dans le ciblage tumoral, une priorité finale a été de déterminer si les TPPOH-X SNPs se localisaient préférentiellement au niveau tumoral par rapport à la TPPOH libre.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Matériels et méthodes

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Chapitre I. Expérimentations *in vitro*

I.1. Matériels

Les milieux de culture RPMI 1640 et DMEM avec ou sans rouge de phénol ainsi que le sérum de veau fœtal, la L-glutamine et la solution de pénicilline/streptomycine ont été achetés chez Gibco BRL (Cergy-Pontoise, France). Le 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide (MTT), la N-acétyl-L-cystéine (NAC), la 3-MA, l'anticorps anti-β-actine, le 5,5′,6,6′-tétrachloro-1,1′,3,3′-tétraéthylbenzimidazole carbocyanine iodide (JC-1) et le kit « cell death detection enzyme-linked immunosorbent assay^{PLUS} (ELISA) » ont été obtenus chez Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Les anticorps anti-Bécline-1, anti-Atg5 et anti-LC3 proviennent de Cell Signaling Technology - Ozyme (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Le kit de détection des ERO cellulaires contenant la 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate (DCFDA) et l'anticorps secondaire anti-lapin IgG H&L couplé à la peroxydase de raifort (HRP) ont été achetés chez Abcam (Paris, France). Le LysoTracker, le MitoTracker, l'anticorps secondaire anti-souris IgG-IgM H&L couplé à l'HRP, le TO-PRO-3, l'annexine V-isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et l'iodure de propidium (IP), le tampon d'échantillon 5X (Pierce™ Lane Marker Reducing Sample Buffer), la membrane de polyfluorure de vinylidène (PVDF) et le marqueur de poids moléculaires (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder) proviennent d'Invitrogen - Thermo Fisher Scientific (Villebon-sur-Yvette, France). Le substrat de révélation de l'HRP « Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate » a été obtenu chez Merck (Lyon, France) ; l'inhibiteur de protéases (cOmplete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail) chez Roche Diagnostics (Meylan, France) et le réactif vert caspase-3/7 chez Sartorius (Göttingen, Allemagne).

I.2. Synthèse de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs

La synthèse et la caractérisation de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs ont été réalisées par notre équipe de recherche et récemment publiées dans le journal Carbohydrate Polymers (232). Les SNPs ont été synthétisées selon la méthode de Stöber avec un diamètre moyen de 80 nm. La TPPOH libre a été synthétisée et conjuguée avec le xylane grâce à une réaction d'estérification pour former la TPPOH-X qui sera ensuite utilisée pour modifier la surface des SNPs. Ces SNPs ont été rendues cationiques par l'intermédiaire de la 3-aminopropyl triéthoxysilane (APTES) permettant la formation de liaisons ioniques avec le xylane par ses groupements d'acides glucuroniques. Les solutions mères de TPPOH libre et TPPOH-X SNPs ont été préparées respectivement dans une solution de diméthylsulfoxyde (DMSO):éthanol (1:9) à 5 mg/mL et dans l'éthanol à 20 mg/mL.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.3. Lignées et culture cellulaires

Les lignées cellulaires étudiées sont des lignées de CCR humain HCT116, HT-29 et SW620. Elles proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC) (LGC Standards, Molsheim, France). La lignée de CCR HCT116 a été isolée d'un carcinome colorectal de stade I d'un homme adulte. La lignée de CCR HT-29 provient d'un adénocarcinome colorectal de stade II d'une femme de 44 ans. Enfin, la lignée de CCR SW620 a été isolée de métastases d'un ganglion lymphatique régional d'un homme de 51 ans atteint d'un adénocarcinome colorectal de stade III.

Ces 3 lignées cellulaires ont été ensemencées dans du milieu de culture RPMI 1640 pour les cellules HCT116 et SW620 et dans du milieu de culture DMEM pour les cellules HT-29. Ces milieux ont été complémentés par 10% de sérum de veau fœtal, par 1% de L-glutamine et par une solution de pénicilline/streptomycine à respectivement 100 U/mL et 100 µg/mL. Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées en atmosphère humide contenant 5% de CO_2 dans une étuve thermostatée à 37°C.

Pour toutes les expérimentations *in vitro*, les lignées cellulaires ont été ensemencées à hauteur de $1{,}2 \times 10^4$; $2{,}1 \times 10^4$ et $1{,}5 \times 10^4$ cellules/cm^2 pour les cellules HCT116, HT-29 et SW620 respectivement. La numération des cellules viables a été réalisée grâce au test d'exclusion au bleu trypan sur cellule de Malassez, les cellules excluant le colorant ont été considérées comme viables.

I.4. Traitements et irradiations

Après 24 h d'adhérence, les cellules ont été traitées ou non pendant une période définie. Les solutions mères de TPPOH libre et de TPPOH-X SNPs ont été diluées dans le milieu de culture afin d'obtenir les concentrations finales appropriées. La même quantité de solvant (éthanol ou DMSO:éthanol) a été ajoutée aux cellules témoins sans dépasser une valeur de 0,6%.

Après la période de traitement, le milieu de culture a été remplacé par le milieu de culture correspondant dépourvu de rouge de phénol. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non par de la lumière rouge entre 630 – 660 nm à une fluence de 75 J/cm^2 grâce à la lampe CURElight (PhotoCure ASA, Oslo, Norvège).

I.5. Étude de la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été étudiée par le test au MTT. Ce test est basé sur la réduction de l'anneau de tétrazolium du MTT en cristaux de formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Cette réduction forme un précipité de couleur violette dans la mitochondrie. La quantité de précipité formée est proportionnelle à la quantité de cellules vivantes (mais également à l'activité métabolique de chaque cellule).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Après solubilisation des cristaux à l'aide du DMSO, un simple dosage de la densité optique à 550 nm par spectrophotométrie permet de déterminer la quantité relative de cellules vivantes. Ce test est mis en place afin de comparer la viabilité des cellules traitées, photoactivées ou non par rapport aux cellules témoins.

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées en plaques 96 puits selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans 100 µL de milieu correspondant. Pour chaque condition analysée, 6 puits ont été réalisés et ce au moins 3 fois (n=3). Après 24 h de croissance cellulaire, les cellules ont été traitées ou non avec la TPPOH libre, les TPPOH-X SNPs ou les SNPs pendant 24 h. Le milieu a ensuite été remplacé par 100 µL de milieu dépourvu de rouge de phénol puis les cellules ont été irradiées ou non. Après 48 h, 10 µL d'une solution de MTT (à 5 mg/mL dans du tampon phosphate salin (PBS)) ont été ajoutés dans chaque puits. À la suite de 3 h d'incubation à 37°C, le milieu a été éliminé puis 200 µL de DMSO ont été ajoutés par puits afin de lyser les membranes cellulaires et libérer les cristaux de formazan formés. L'absorbance de chaque puits a ensuite été mesurée à 550 nm grâce au lecteur de plaques Finstruments™ Multiskan (Labsystems Diagnostics Oy, Vantaa, Finlande). Les blancs de lecture correspondent aux puits contenant uniquement 200 µL de DMSO. Les résultats de viabilité cellulaire sont présentés en pourcentage par rapport au témoin : (DO moyenne des cellules traitées / DO moyenne des cellules témoins) x 100 ± SEM. Les IC_{50} pour chaque lignée cellulaire et chaque molécule correspondent à la concentration à laquelle seulement 50% des cellules sont viables par rapport aux cellules témoins.

I.6. Dosage du taux cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène

La production cellulaire d'ERO a été quantifiée grâce au kit « 2',7'-dichlorofluorescein diacetate cellular reactive oxygen species detection assay kit ». Cette technique repose sur l'utilisation de la DCFDA. Après diffusion dans la cellule, la DCFDA va être désacétylée par les estérases cellulaires en un composé non-fluorescent. Ce dernier va ensuite pouvoir être oxydé par les ERO cellulaires produites conduisant à la formation de la 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF). Le DCF est un composé fluorescent détectable en cytométrie en flux (excitation 485 nm ; émission 535 nm). L'hydroperoxyde de tert-butyle (TBHP) a été utilisé comme témoin positif à 250 µM.

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées en plaques 6 puits selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans 2 mL de milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été marquées avec la DCFDA pendant 30 min à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol puis elles ont été irradiées ou non. Afin de confirmer l'inhibition de la génération d'ERO, un prétraitement avec un piégeur d'ERO, la NAC, a été réalisé. Dans ce cas, les cellules ont été prétraitées durant 1 h avec la NAC à 10 mM avant d'être irradiées. La génération d'ERO cellulaires a ensuite été quantifiée 4 h après irradiation par analyse en cytométrie en flux.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.7. Étude de l'internalisation et de la localisation cellulaire

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées en plaques 6 puits selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans 2 mL de milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées avec la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs à la même concentration (1 µM en TPPOH). Après 2 , 6 , 12 et 24 h d'incubation, la fluorescence naturelle de la TPPOH (excitation 405 nm ; émission 650 nm) a été analysée par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® et les données ont été analysées avec le logiciel IDEAS® (Merck).

La localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs a été également analysée par l'AMNIS®. Les cellules ont été cultivées et traitées comme décrit précédemment puis co-traitées à 37°C avec du LysoTracker à 75 nM pendant 2 h ou du MitoTracker à 150 nM pendant 45 min. Les fluorescences de la TPPOH, du LysoTracker (excitation 578 nm ; émission 603 nm) et du MitoTracker (excitation 490 nm ; émission 516 nm) ont été analysées et la co-localisation entre TPPOH et Lyso/MitoTracker a été déterminée grâce au coefficient de corrélation de Pearson. La localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs a été confirmée par microscopie confocale. Les cellules ont été cultivées, traitées et co-traitées comme décrit précédemment mais elles ont été transférées dans des Lab-Tek afin de pouvoir être analysées par microscopie. Les photographies ont été prises grâce au microscope confocal Laser Carl Zeiss LSM 510 Meta – x200 (Marly le Roi, France) et la co-localisation a été analysée grâce au logiciel de traitement d'images ImageJ.

I.8. Analyses en microscopie électronique à transmission

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées en plaques 6 puits selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans 2 mL de milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été récupérées pour les études d'internalisation cellulaire. Pour les études sur la mort cellulaire, les cellules ont ensuite été irradiées ou non et récupérées 48 h après l'irradiation. Suite aux différents protocoles, les cellules ont été immédiatement incubées dans une solution d'1% de tétroxyde d'osmium pendant 30 min à température ambiante. Puis, elles ont été déshydratées avec des concentrations croissantes d'éthanol et incorporées dans la résine. Les blocs de résine contenant les cellules ont ensuite été polymérisés pendant au moins 48 h à 60°C puis des sections ultraminces (80 – 100 nm) ont été préparées et déposées sur des grilles. Ces grilles ont ensuite été marquées avec l'acétate d'uranyle et le citrate de plomb et examinées avec le microscope électronique à transmission (MET) JEM-1011 (JEOL, Croissy-sur-Seine, France) fonctionnant à 80 KeV.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.9. Analyse de l'expression des protéines

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées dans des flacons de culture de 25 cm^2 selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans 5 mL de milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Après 24 h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol puis les cellules ont été traitées ou non avec un inhibiteur pharmacologique de l'autophagie, la 3-MA à 2 mM, et les cellules ont ensuite été irradiées ou non.

I.9.1. Extraction des protéines

Les culots cellulaires ont été lysés dans du tampon RIPA (HEPES 50 mM pH = 7,5 ; Déoxycholate 1% ; Nonidet P-40 1% ; SDS 0,1% ; NaCl 150 mM et Aprotinine 20 µg/ml) contenant une solution d'inhibiteurs de protéases. Les lysats ont ensuite été récupérés après centrifugation (12 000 rpm à 4°C pendant 20 min). Les concentrations protéiques ont été déterminées par la technique colorimétrique de Bradford. La densité optique de chaque condition a été analysée par spectrophotométrie à 595 nm et comparée à une gamme étalon d'albumine de sérum bovin (BSA) de 0 à 2 mg/mL.

I.9.2. Expression des protéines

Les protéines (50 µg) ont été ajoutées à une solution d'eau et de tampon d'échantillon 5X puis dénaturées 5 min à 95°C. Les protéines ont ensuite été séparées sur un gel d'électrophorèse dénaturant (SDS-PAGE) (10 à 12% selon les protéines). La migration a été effectuée pendant environ 2 h à 90 V dans du tampon de migration (Tris-HCl 25 mM pH 8,3 ; Glycine 192 mM et SDS 0,1%) grâce au système (XCell SureLock Mini-Cell Electrophoresis System, Thermo Fisher Scientific). Suite à la migration, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF. Cette membrane a été préalablement activée dans du méthanol, rincée puis équilibrée tout comme le gel de polyacrylamide contenant les protéines dans du tampon de transfert (Tris 50 mM ; Glycine 380 mM ; SDS 0,1% et Méthanol 20%). Le transfert a été effectué à 100 mA pendant 1 h 30. La membrane a ensuite été incubée pendant au moins 1 h dans du tampon de blocage (TBS 1X-Lait 5%) sous agitation à température ambiante afin de saturer les sites aspécifiques. Les anticorps primaires ont été incubés dans du tampon de blocage une nuit sous agitation à 4°C. Les membranes ont ensuite été rincées plusieurs fois dans du tampon de rinçage (TBS 1X-Tween 0,1%) avant d'être incubées avec les anticorps secondaires correspondants sous agitation à température ambiante au moins 1 h. Les membranes ont ensuite été rincées dans du tampon de rinçage afin d'éliminer l'excès d'anticorps secondaires. La révélation a été réalisée par une réaction de chimiluminescence en utilisant le substrat de révélation de l'HRP et le système G:BOX (Syngene, Cambridge, Royaume-Uni). Les poids moléculaires des bandes spécifiques ainsi révélées ont été déterminés grâce au marqueur de poids moléculaires. L'intensité relative des bandes a été déterminée grâce au logiciel de traitement d'images ImageJ et la β-actine a été utilisée comme protéine de référence.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Protéine	Source	Dilution
Bécline-1	Lapin	1/1000ème
Atg5	Lapin	1/1000ème
LC3	Lapin	1/1000ème
β-actine	Souris	1/5000ème

I.10. Étude de la mort cellulaire

Pour toutes les études sur la mort cellulaire (sauf pour l'analyse des caspases 3/7 activées), les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées dans des flacons de culture de 25 cm^2 selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans 5 mL de milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Après 24 h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol puis les cellules ont été traitées ou non avec un inhibiteur pharmacologique de l'autophagie, la 3-MA à 2 mM, et les cellules ont ensuite été irradiées ou non.

I.10.1. Étude du potentiel membranaire mitochondrial

Le ΔΨm a été estimé grâce à l'utilisation de la sonde 5,5′,6,6′-tétrachloro-1,1′,3,3′-tétraéthylbenzimidazole carbocyanine iodide (JC-1). C'est un composé sous forme de monomère à faible concentration qui fluoresce en vert (520 nm), et sous forme d'agrégats à forte concentration qui fluoresce en rouge (590 nm). JC-1 est une sonde lipophile cationique qui s'accumule dans les mitochondries viables. Les mitochondries ayant un ΔΨm intact concentrent la sonde JC-1 sous forme d'agrégats et produisent une fluorescence rouge. Au contraire, les mitochondries ayant un ΔΨm altéré ne peuvent plus concentrer la sonde JC-1 qui se trouve de ce fait sous forme de monomères qui fluorescent en vert.

Des culots cellulaires de 10^6 cellules ont été récupérés 48 h après l'irradiation. Les cellules ont ensuite été marquées avec la sonde JC-1 (1 µg/mL) pendant 30 min à 37°C. Après un lavage, les cellules ont été marquées avec le TO-PRO-3 (1 µM) (marqueur nucléaire des cellules ayant perdu leur intégrité cellulaire) et le ΔΨm a été immédiatement estimé par analyse en cytométrie en flux.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.10.2. Analyse multiparamétrique de l'apoptose grâce à l'annexine V et l'iodure de propidium

Cette technique d'analyse de l'apoptose repose sur l'utilisation de l'annexine V qui est une protéine possédant une forte affinité pour les phosphatidylsérines. Par couplage de l'annexine V avec un fluorochrome, le FITC, il est possible de détecter les cellules en phase précoce d'apoptose. En effet, dans des conditions normales, les phosphatidylsérines se retrouvent uniquement exposées dans le milieu intracellulaire. Dans les conditions normales, les cellules seront donc annexine V négatives. En revanche, l'un des premiers évènements de l'entrée en apoptose d'une cellule est le phénomène de flip flop ATP-dépendant effectué par l'enzyme flipase qui entraîne la translocation des phosphatidylsérines avec une exposition intracellulaire vers l'extérieur de la membrane plasmique. Les cellules entrant dans le processus apoptotique seront donc annexine V positives. Afin de discriminer les cellules en phase précoce et en phase tardive du processus apoptotique, l'annexine V est couplée à l'iodure de propidium. L'IP est un agent intercalant de l'ADN qui ne pénètre dans les cellules que lorsque la membrane plasmique est altérée, c'est-à-dire lorsque les cellules sont en phase tardive d'apoptose ou lors de la nécrose. Les cellules vivantes seront donc annexine V neg. / IP neg. ; les cellules en apoptose précoce annexine V pos. / IP neg. et les cellules en apoptose tardive annexine V pos. / IP pos. La condition correspondant à l'annexine V neg. / IP pos. concerne les débris nucléaires.

Des culots cellulaires de 10^5 cellules ont été récupérés 48 h après l'irradiation. Les cellules ont ensuite été reprises dans 100 µL de tampon annexine V et marquées avec 5 µL d'annexine V-FITC et 1 µL d'IP (1,5 µM) pendant 15 min à température ambiante. Puis, 400 µL de tampon annexine V sont ajoutés avant que le pourcentage de cellules en apoptose soit déterminé par une analyse en cytométrie en flux.

I.10.3. Analyse quantitative des caspases 3/7 activées

L'analyse quantitative des caspases 3/7 activées a été réalisée avec le système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte® S3 (Sartorius) et le réactif vert caspase 3/7. Cette technique repose sur l'analyse vidéo au cours du temps de la fluorescence verte émise par le réactif caspase 3/7. Ce réactif associe le motif de reconnaissance caspase 3/7 activée (DEVD) au Nucview™488, un colorant intercalant de l'ADN qui permet de quantifier l'apoptose au fil du temps. Ce réactif inerte et non fluorescent est directement ajouté au milieu de culture afin qu'il se concentre directement dans les cellules. Lorsque les cellules sont viables, le motif DEVD n'est pas clivé par les caspases 3/7 et aucune fluorescence n'est détectée. En revanche, lorsque les cellules sont en phase apoptotique, les caspases 3/7 activées sont capables de cliver le motif DEVD libérant ainsi le colorant intercalant de l'ADN. Une fluorescence nucléaire verte est alors détectée lorsque les cellules sont en phase apoptotique.

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées en plaques 96 puits selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans 100 µL de milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Après 24 h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol puis les cellules ont été irradiées ou non.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Les cellules ont ensuite été traitées avec le réactif vert caspase 3/7 (5 µM) et placées dans le système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte® S3. Toutes les 2 h, des images des cellules ont été prises à hauteur de 4 images par puits en contraste de phase et en fluorescence verte en utilisant l'objectif x10. La quantité de cellules en apoptose a été quantifiée avec le logiciel IncuCyte® (Sartorius) en utilisant le rapport du nombre de cellules fluorescentes en vert par rapport au nombre de cellules totales dans chaque puits au cours du temps sur 48 h.

I.10.4. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN

La fragmentation de l'ADN a été quantifiée par le kit « cell death detection enzyme-linked immunosorbent assay^{PLUS} » (233). Des culots cellulaires de 10^5 cellules ont été récupérés 48 h après l'irradiation. Chaque culot cellulaire a ensuite été repris dans 200 µL de tampon de lyse durant 30 min à température ambiante. Après centrifugation (10 min à 200 g), 20 µL de surnageant du lysat cellulaire ont été déposés dans des puits recouverts de streptavidine. Ensuite, 80 µL d'une solution contenant des anticorps anti-histones biotinylés et des anticorps anti-ADN conjugués à la peroxydase ont été ajoutés dans chaque puits. Au cours des 2 h d'incubation sous agitation, les mono et oligo-nucléosomes formés lors de la fragmentation de l'ADN sont complexés par les anticorps anti-ADN conjugués à la peroxydase et par les anticorps anti-histones qui seront eux-mêmes capturés au fond des puits par la streptatividine. Après plusieurs lavages successifs, 100 µL d'une solution d'acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique) (ABTS), le substrat de la peroxydase, ont été ajoutés par puits. Lors de l'incubation, environ 15 min, une réaction colorimétrique se développe entre l'ABTS et la peroxydase présente sur les anticorps anti-ADN. La quantité d'ABTS oxydé est donc proportionnelle à la quantité d'ADN fragmenté de chaque condition. La réaction a ensuite été stoppée et la densité optique de chaque condition a été mesurée à 405 nm. Le blanc de lecture est représenté par la solution d'ABTS avec la longueur d'onde de référence de 490 nm. Les valeurs moyennes d'absorbances (405 nm – 490 nm) ont ensuite été déterminées pour chaque condition et comparées aux valeurs obtenues pour les conditions témoins. La quantité de fragmentation dans les conditions témoins est normalisée à 1 et celle des conditions traitées est exprimée en n-fold comparé au témoin.

I.11. Analyses statistiques

Tous les résultats quantitatifs sont exprimés comme la moyenne ± l'erreur type de la moyenne (SEM) d'analyses distinctes. La significativité statistique a été évaluée grâce au test de Student bilatéral non-apparié et exprimée selon $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ et $***p < 0,001$. Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Chapitre II. Expérimentations *in vivo*

II.1. Création d'un modèle de xénogreffe sous-cutanée de cancer colorectal humain

Afin d'établir un modèle de xénogreffe sous-cutanée de CCR humain, les cellules HT-29, les plus résistantes dans cette étude, ont été utilisées. Le modèle a été réalisé sur des souris femelles immunodéficientes (Balb/c-nu) âgées de 4 semaines et d'environ 20 g (Janvier Labs, Le Genest-Saint-Isle, France). Une solution de PBS:Matrigel® (1:1) (Corning, Avon, France) contenant $5x10^7$ cellules par mL a été injectée en sous-cutané de chaque côté de la région dorsale des souris à hauteur de 100 µL par injection. Ainsi chaque souris porte 2 xénogreffes de $5x10^6$ cellules chacune. La matrice de Matrigel® a été utilisée dans le but de faciliter la prise des xénogreffes. Les 2 principaux avantages des xénogreffes sous-cutanées sont une accessibilité et une évaluation simple des traitements en comparaison des xénogreffes orthotopiques au niveau colorectal. La croissance tumorale a été mesurée tous les 2 jours grâce à un pied à coulisse et le volume tumoral a été calculé selon la formule $V = 4\pi/3 \times LW^2/8$ où L correspond à la longueur et W à la largeur de la tumeur (132).

II.2. Traitements et irradiations

Lorsque les tumeurs ont atteint un volume de l'ordre de 100 à 150 mm^3, les souris ont été divisées aléatoirement en 5 groupes de 6 souris : témoin, TPPOH libre, TPPOH-X SNPs, TPPOH-X SNPs + 3-MA et TPPOH-X SNPs multi. Les souris ont ensuite été traitées par injection au niveau de la veine caudale de 100 µL de PBS pour le groupe témoin ou d'une solution contenant les traitements à 1/100ème de la dose létale 50 (LD_{50}) calculée selon la formule $\text{Log } LD_{50} = 0.435 \log IC_{50} (mM) + 0.625$ (234). Les souris du groupe TPPOH libre ont donc reçu 100 µL d'une solution à 3,26 mg/kg de TPPOH libre et les souris des groupes TPPOH-X SNPs, TPPOH-X SNPs + 3-MA et TPPOH-X SNPs multi ont reçu 100 µL d'une solution à 1,16 mg/kg de TPPOH et 334 mg/kg de SNPs. Les souris du groupe TPPOH-X SNPs + 3-MA ont reçu en plus une injection intrapéritonéale de 100 µL d'une solution à 24 mg/kg de 3-MA (235). Après 24 h, une seule tumeur par souris a été irradiée afin de comparer l'efficacité de la photoactivation intra-individu. Par conséquent, 10 conditions ont été analysées puisque chaque groupe a été divisé en 2 conditions : une sans irradiation et une avec irradiation. L'irradiation des tumeurs a été réalisée avec un laser rouge à 660 nm d'une puissance de 100 mW (Z-LASER, Fribourg-en-Brisgau, Allemagne). Le protocole de PDT a été effectué selon 2 séquences de 5 min d'irradiation séparées de 5 min à une fluence de 200 J/cm^2 (72). Pour le groupe TPPOH-X SNPs multi, le même protocole de traitement et d'irradiation a été effectué tous les 5 j.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

II.3. Étude de l'efficacité anti-tumorale et de la biocompatibilité

Une souris de chaque groupe, à l'exception du groupe TPPOH-X SNPs multi, a été sacrifiée 24 h après l'irradiation. Après extraction, les 2 tumeurs de chaque souris ont été fixées dans une solution de 4% en paraformaldéhyde afin de préparer l'inclusion en paraffine. Après une succession de cycles de déshydratation, les échantillons ont été inclus en paraffine puis coupés à l'aide d'un microtome afin d'effectuer des marquages histologiques avec une coloration à l'hématoxyline, à l'éosine et au safran (HES) ou immunohistochimiques. Le niveau d'apoptose au niveau des tumeurs a été analysé grâce à la technique TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling). Le marquage TUNEL est une méthode de détection de la fragmentation apoptotique de l'ADN. Cette méthode repose sur l'utilisation de la désoxynucléotidine terminale transférase (Tdt), une enzyme qui catalyse la fixation de désoxynucléotides marqués d'un fluorochrome ou d'un anticorps couplé à la peroxydase (POD) au 3'-hydroxyle terminal des cassures de l'ADN double brin générées lors de l'apoptose. Le niveau d'autophagie au niveau des tumeurs a été lui analysé par un marquage des protéines LC3. Le marquage TUNEL a été réalisé grâce au « cell death detection kit POD » (Roche Diagnostics) et le marquage des protéines LC3 avec le même anticorps utilisé lors des expérimentations *in vitro* à 1/200ème. Les marquages ont été révélés par « ACUITYadvanced biotin free polymer detection system DAB » (BioLegend, Londres, Royaume-Uni).

Pour toutes les autres souris, le poids et la croissance tumorale ont été mesurés tous les 2 j. Les souris ont ensuite été sacrifiées à 20 j après la première injection de traitement et le poids des tumeurs a été analysé après extraction. Les tumeurs extraites ainsi que les organes majeurs tels que les reins, le foie, la rate, les poumons et le cœur ont été récupérés et fixés dans une solution de 4% en paraformaldéhyde. Après inclusion en paraffine et coupe, les échantillons ont été marqués à l'HES avec l'automate de colorations standards Tissue Tek (Sakura, Alphen-sur-le-Rhin, Pays-Bas) afin d'étudier la structure/morphologie des tumeurs selon les différents traitements ainsi que la biocompatibilité de ces derniers sur les organes majeurs. Les tumeurs ont également été marquées au Ki-67 avec l'automate d'immunohistochimie BenchMark Ultra Ventana (Roche Diagnostics) afin d'étudier la prolifération des cellules tumorales. Toutes les analyses histologiques ont été visualisées avec un scanner optique en fond clair NanoZoomer RS2 (Hamamatsu Photonics, Massy, France) et étudiées avec le logiciel NDPView.

II.4. Analyse de la biodistribution

Afin de déterminer la biodistribution de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs, ces molécules ont été marquées avec la cyanine 5.5 (Lumiprobe, Hanovre, Allemagne) pour pouvoir les suivre par fluorescence puisque le spectre d'émission de la TPPOH se superpose avec celui de l'hémoglobine. Des xénogreffes sous-cutanées ont été réalisées selon le protocole décrit précédemment, les souris ont ensuite été divisées aléatoirement en 2 groupes de 3 souris : Cy5.5-TPPOH libre et Cy5.5-TPPOH-X SNPs. Les souris ont ensuite été traitées par injection au niveau de la veine caudale de 100 µL d'une solution contenant les traitements à 1/100ème de la LD_{50}.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Les souris du groupe Cy5.5-TPPOH libre ont donc reçu 100 µL d'une solution à 3,26 mg/kg de Cy5.5-TPPOH libre et les souris du groupe Cy5.5-TPPOH-X SNPs ont reçu 100 µL d'une solution à 1,16 mg/kg de Cy5.5-TPPOH et 334 mg/kg de SNPs. La biodistribution des traitements a été déterminée 24 h après l'injection grâce au système « IVIS Lumina quantitative fluorescence imaging system » (PerkinElmer, Villepinte, France). Ensuite, les souris ont été sacrifiées et la biodistribution *ex vivo* des tumeurs et des organes majeurs a été analysée avec le même système. L'intensité relative du signal de fluorescence dans les tumeurs et dans les organes a été calculée grâce au logiciel « Living Image » (PerkinElmer), comme le rendement rayonnant en [photons/s/cm^2/sr]/[µW/cm^2] par pixel de chaque région d'intérêt délimitée autour des tumeurs ou des organes.

II.5. Déclaration éthique

L'approbation du comité d'examen institutionnel a été obtenue du Comité régional d'éthique de l'expérimentation animale (numéro d'approbation : #16335-2018073009499570 v3). Toutes les expériences *in vivo* et les protocoles expérimentaux ont été conformes aux recommandations de la directive européenne du 22 septembre 2010 (2010/63/UE) sur la protection des animaux utilisés à des fins scientifiques. Tous les efforts ont été mis en œuvre pour réduire le nombre d'animaux utilisés et pour garantir des conditions optimales de bien-être avant, pendant et après chaque expérience.

II.6. Analyses statistiques

Tous les résultats quantitatifs sont exprimés comme la moyenne ± l'erreur type de la moyenne (SEM) d'analyses distinctes. La significativité statistique a été évaluée grâce au test de Student bilatéral non-apparié et exprimée selon *$p < 0,05$; **$p < 0,01$ et avec NS considéré comme non significatif. Toutes les expériences ont été réalisées sur au moins 3 souris.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Partie expérimentale

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Chapitre I. Expérimentations *in vitro*

I.1. Étude de la viabilité cellulaire

Afin d'étudier la phototoxicité des molécules *in vitro*, les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans du milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non par une gamme de concentrations croissantes avec la TPPOH libre, les TPPOH-X SNPs ou les SNPs. Après 24 h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol puis les cellules ont été irradiées ou non. La viabilité des cellules a alors été analysée 48 h après l'irradiation par le test au MTT **(Figures 69-71)**. Les IC_{50} pour chaque molécule et chaque lignée cellulaire ont ensuite été calculées en vue de les comparer **(Figure 72)**.

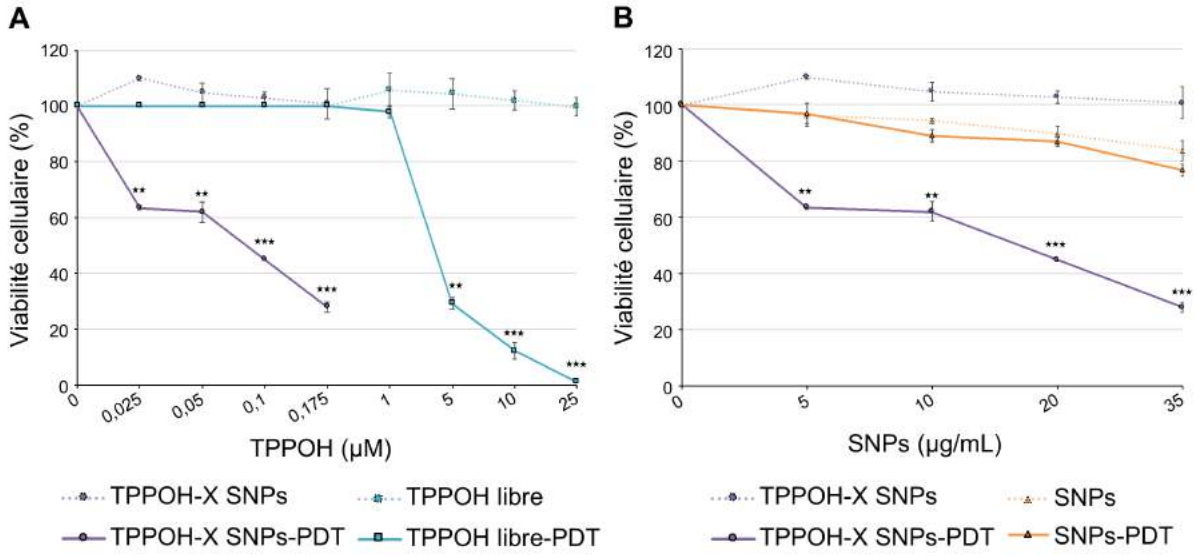


Figure 69 : effet de la TPPOH libre, des TPPOH-X SNPs et des SNPs sur la viabilité des cellules HCT116

A : Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec une gamme de concentrations croissantes de TPPOH libre ou de TPPOH-X SNPs basée sur la concentration en TPPOH (µM). Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. La phototoxicité a été déterminée 48 h après irradiation par le test au MTT. La viabilité cellulaire de chaque condition est exprimée en pourcentage en comparaison à la condition témoin. **B** : Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec une gamme de concentrations croissantes de SNPs ou de TPPOH-X SNPs basée sur la concentration en SNPs (µg/mL). Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. La phototoxicité a été déterminée 48 h après irradiation par le test au MTT. La viabilité cellulaire de chaque condition est exprimée en pourcentage en comparaison à la condition témoin. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 3$ et $^{**}p < 0{,}01$; $^{***}p < 0{,}001$.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

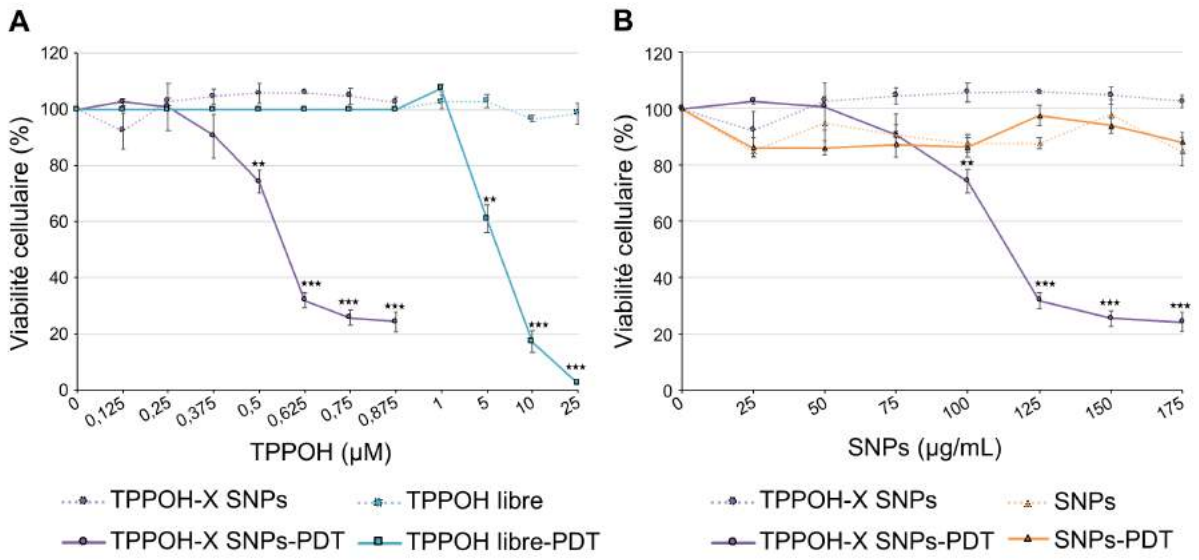


Figure 70 : effet de la TPPOH libre, des TPPOH-X SNPs et des SNPs sur la viabilité des cellules HT-29

A : Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec une gamme de concentrations croissantes de TPPOH libre ou de TPPOH-X SNPs basée sur la concentration en TPPOH (µM). Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. La phototoxicité a été déterminée 48 h après irradiation par le test au MTT. La viabilité cellulaire de chaque condition est exprimée en pourcentage en comparaison à la condition témoin. **B** : Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec une gamme de concentrations croissantes de SNPs ou de TPPOH-X SNPs basée sur la concentration en SNPs (µg/mL). Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. La phototoxicité a été déterminée 48 h après irradiation par le test au MTT. La viabilité cellulaire de chaque condition est exprimée en pourcentage en comparaison à la condition témoin. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 3$ et $^{**}p < 0{,}01$; $^{***}p < 0{,}001$.

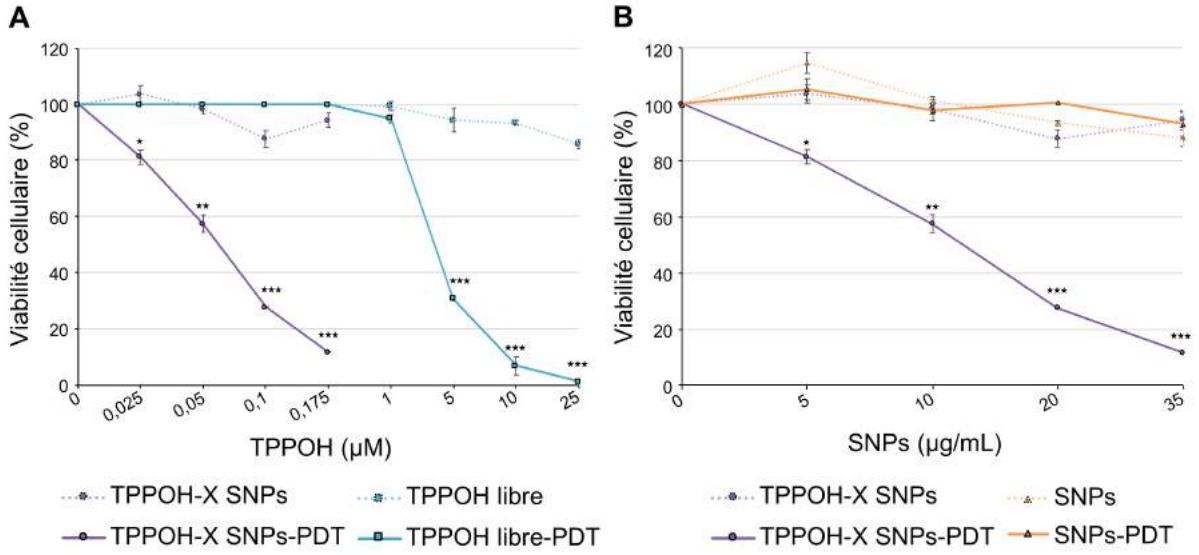


Figure 71 : effet de la TPPOH libre, des TPPOH-X SNPs et des SNPs sur la viabilité des cellules SW620

A : Les cellules SW620 ont été traitées ou non avec une gamme de concentrations croissantes de TPPOH libre ou de TPPOH-X SNPs basée sur la concentration en TPPOH (µM). Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. La phototoxicité a été déterminée 48 h après irradiation par le test au MTT. La viabilité cellulaire de chaque condition est exprimée en pourcentage en comparaison à la condition témoin. **B** : Les cellules SW620 ont été traitées ou non avec une gamme de concentrations croissantes de SNPs ou de TPPOH-X SNPs basée sur la concentration en SNPs (µg/mL). Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. La phototoxicité a été déterminée 48 h après irradiation par le test au MTT. La viabilité cellulaire de chaque condition est exprimée en pourcentage en comparaison à la condition témoin. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 3$ et $^{*}p < 0{,}05$; $^{**}p < 0{,}01$; $^{***}p < 0{,}001$.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

IC_{50} (nM)	HCT116	HT-29	SW620
TPPOH libre-PDT	**2 943,2 ± 101,6**	**5 958,6 ± 430,3**	**2 980,4 ± 67,9**
TPPOH-X SNPs-PDT	**72,6 ± 2,8**	**550,2 ± 7,5**	**75,4 ± 11,4**
Fold	**40,5**	**10,8**	**39,5**

Figure 72 : tableau récapitulatif des IC_{50} calculées

Les IC_{50}, exprimées en nM, pour chaque lignée cellulaire et chaque molécule correspondent à la concentration à laquelle seulement 50% des cellules sont viables par rapport aux cellules témoins. Les « fold » représentent le facteur de diminution d'IC_{50} des TPPOH-X SNPs par rapport à la TPPOH libre après irradiation.

Ces résultats montrent, quel que soit la lignée cellulaire concernée, que la TPPOH libre et les TPPOH-X SNPs n'induisent pas d'effet phototoxique quand les cellules n'ont pas été irradiées **(Figures 69-71A)**. La TPPOH libre ou vectorisée répond donc à l'un des critères idéaux d'un PS, c'est à dire la non-toxicité en absence de lumière. En revanche, lorsque les cellules ont été irradiées, la TPPOH libre et les TPPOH-X SNPs induisent une diminution significative de la viabilité cellulaire de façon dose-dépendante sur les 3 lignées cellulaires **(Figures 69-71A)**. Cependant, les TPPOH-X SNPs-PDT sont beaucoup plus phototoxiques que la TPPOH libre-PDT puisque des doses plus importantes en TPPOH libre-PDT sont nécessaires afin de diminuer de 50% la viabilité cellulaire. Afin d'éliminer un potentiel effet des SNPs sur la viabilité cellulaire, les cellules ont été traitées à des concentrations basées sur la quantité de SNPs puis irradiées ou non. Les résultats montrent que quel que soit les concentrations testées, photoactivées ou non, les SNPs seules n'induisent pas de diminution significative de la viabilité cellulaire sur les cellules HCT116, HT-29 et SW620 **(Figures 69-71B)**.

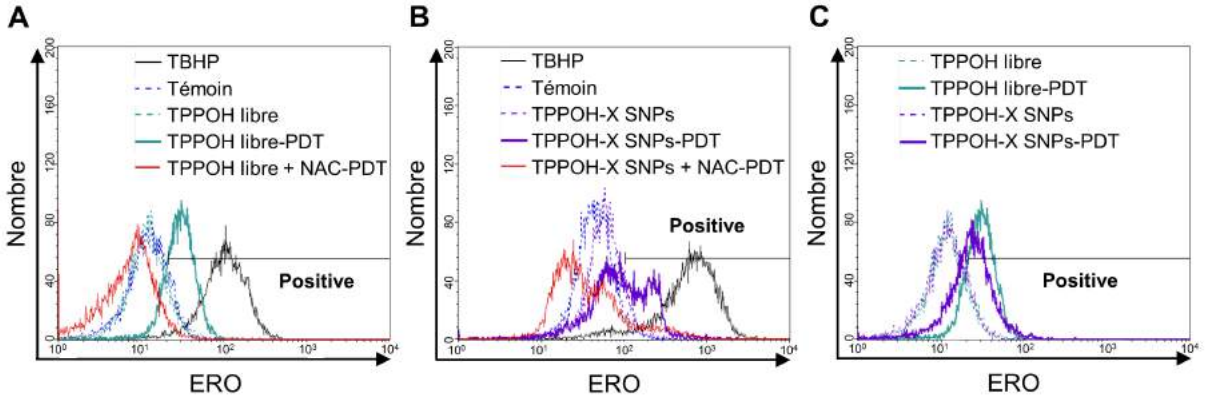
Afin de comparer la phototoxicité de la TPPOH libre-PDT par rapport aux TPPOH-X SNPs-PDT pour chaque lignée cellulaire, les IC_{50} ont ensuite été calculées **(Figure 72)**. Les IC_{50} montrent bien que les TPPOH-X SNPs-PDT sont beaucoup plus phototoxiques que la TPPOH libre-PDT. En effet, pour les cellules HCT116, l'IC_{50} avec les TPPOH-X SNPs-PDT est de 72,6 nM contre environ 3 000 nM avec la TPPOH libre-PDT, soit une efficacité de plus de 40 fois supérieure. La même tendance est observée sur les cellules SW620 où l'IC_{50} avec les TPPOH-X SNPs-PDT est de 75,4 nM contre environ 3 000 nM avec la TPPOH libre-PDT, soit une efficacité de plus de 39 fois supérieure. En revanche, les cellules HT-29 semblent plus résistantes que les cellules HCT116 et SW620 avec des IC_{50} plus élevées de l'ordre de 7 fois pour les TPPOH-X SNPs-PDT avec une valeur de 550 nM et de 2 fois pour la TPPOH libre-PDT avec une valeur d'environ 6 000 nM. Cependant, l'intérêt de la vectorisation avec les SNPs reste tout de même très intéressant puisque les TPPOH-X SNPs-PDT présentent une efficacité de plus de 10 fois supérieure à celle de la TPPOH libre-PDT sur les cellules HT-29.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.2. Dosage du taux cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène

Comme la mort cellulaire induite par PDT est basée sur la production cellulaire d'ERO, cette production a été quantifiée dans les cellules HCT116, HT-29 et SW620 selon les différentes conditions.

Les cellules ont été ensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans du milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été marquées avec la DCFDA. Ensuite, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol puis les cellules ont été irradiées ou non. Afin de confirmer l'inhibition de la production d'ERO, un prétraitement avec un piégeur d'ERO, la NAC, a été réalisé alors que le TBHP a lui été utilisé comme témoin positif. La production d'ERO cellulaires a ensuite été quantifiée par analyse en cytométrie en flux et interprétée grâce aux médianes d'intensités de fluorescence (MFI) et au % de fluorescence positive **(Figures 73-75)**.



	$MFI_{(totale)}$	% de positive
TBHP	103,66	98,19
Témoin	12,63	13,80
TPPOH libre	12,08	12,58
TPPOH libre-PDT	29,69	81,08
TPPOH libre + NAC-PDT	8,06	3,14

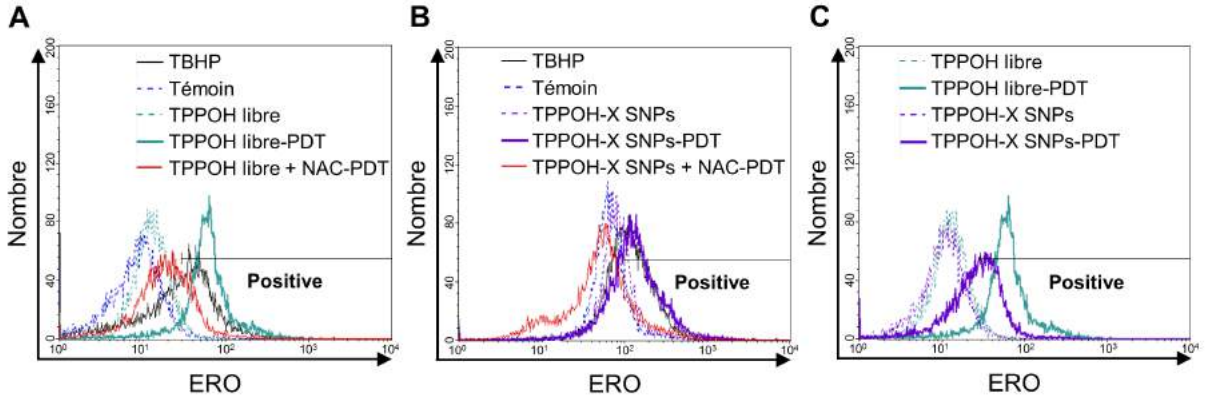
	$MFI_{(totale)}$	% de positive
TBHP	661,17	95,11
Témoin	45,32	3,51
TPPOH-X SNPs	59,35	9,67
TPPOH-X SNPs-PDT	87,38	41,66
TPPOH-X SNPs + NAC-PDT	29,96	11,03

	$MFI_{(totale)}$	% de positive
TPPOH libre	12,08	12,58
TPPOH libre-PDT	29,69	81,08
TPPOH-X SNPs	11,97	11,60
TPPOH-X SNPs-PDT	23,29	57,35

Figure 73 : dosage des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules HCT116

A : Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec la TPPOH libre à l'IC_{50} déterminée. Les cellules ont ensuite été prétraitées ou non avec la NAC et le TBHP puis irradiées ou non. **B** : Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée. Les cellules ont ensuite été prétraitées ou non avec la NAC et le TBHP puis irradiées ou non. **C** : Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec la TPPOH libre et les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. La production d'ERO a ensuite été quantifiée par analyse en cytométrie en flux et interprétée grâce aux MFI et au % de fluorescence positive données dans les tableaux.

Licence CC BY-NC-ND 3.0



	$MFI_{(totale)}$	% de positive
TBHP	31,62	53,68
Témoin	8,98	1,66
TPPOH libre	12,98	4,30
TPPOH libre-PDT	58,82	91,96
TPPOH libre + NAC-PDT	19,28	26,63

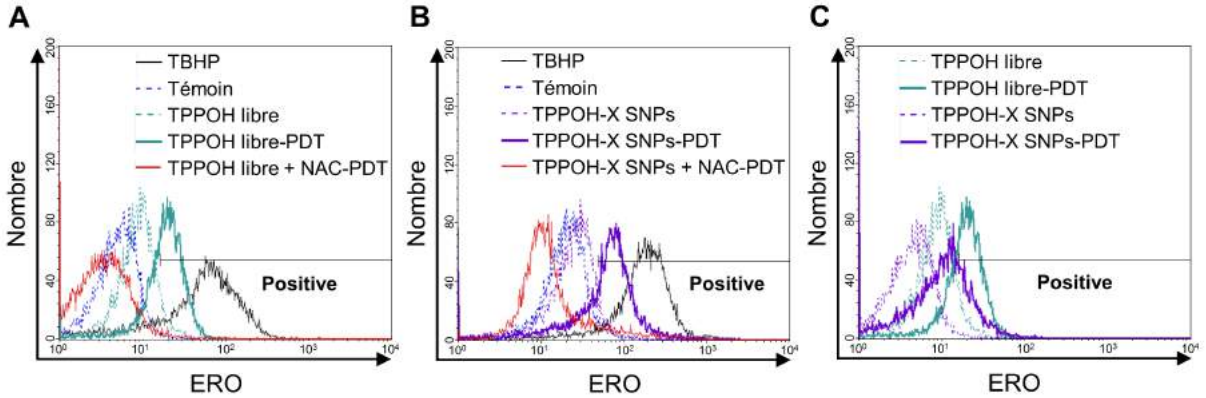
	$MFI_{(totale)}$	% de positive
TBHP	111,40	58,08
Témoin	66,12	14,73
TPPOH-X SNPs	79,86	27,01
TPPOH-X SNPs-PDT	126,35	66,75
TPPOH-X SNPs + NAC-PDT	52,80	16,36

	$MFI_{(totale)}$	% de positive
TPPOH libre	12,98	4,30
TPPOH libre-PDT	58,82	91,96
TPPOH-X SNPs	10,84	2,46
TPPOH-X SNPs-PDT	27,63	46,71

Figure 74 : dosage des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules HT-29

A : Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec la TPPOH libre à l'IC_{50} déterminée. Les cellules ont ensuite été prétraitées ou non avec la NAC et le TBHP puis irradiées ou non. **B** : Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée. Les cellules ont ensuite été prétraitées ou non avec la NAC et le TBHP puis irradiées ou non. **C** : Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec la TPPOH libre et les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. La production d'ERO a ensuite été quantifiée par analyse en cytométrie en flux et interprétée grâce aux MFI et au % de fluorescence positive données dans les tableaux.

Licence CC BY-NC-ND 3.0



	$MFI_{(totale)}$	% de positive
TBHP	56,74	82,48
Témoin	5,28	0,72
TPPOH libre	9,06	7,50
TPPOH libre-PDT	19,46	66,76
TPPOH libre + NAC-PDT	3,40	1,26

	$MFI_{(totale)}$	% de positive
TBHP	182,69	93,97
Témoin	21,10	3,42
TPPOH-X SNPs	26,18	7,31
TPPOH-X SNPs-PDT	68,54	71,21
TPPOH-X SNPs + NAC-PDT	11,04	7,99

	$MFI_{(totale)}$	% de positive
TPPOH libre	9,06	7,50
TPPOH libre-PDT	19,46	66,76
TPPOH-X SNPs	4,49	0,54
TPPOH-X SNPs-PDT	10,84	25,69

Figure 75 : dosage des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules SW620

A : Les cellules SW620 ont été traitées ou non avec la TPPOH libre à l'IC_{50} déterminée. Les cellules ont ensuite été prétraitées ou non avec la NAC et le TBHP puis irradiées ou non. **B** : Les cellules SW620 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée. Les cellules ont ensuite été prétraitées ou non avec la NAC et le TBHP puis irradiées ou non. **C** : Les cellules SW620 ont été traitées ou non avec la TPPOH libre et les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. La production d'ERO a ensuite été quantifiée par analyse en cytométrie en flux et interprétée grâce aux MFI et au % de fluorescence positive données dans les tableaux.

Ces résultats montrent que, quelle que soit la lignée cellulaire concernée, la TPPOH libre produit des ERO uniquement lorsqu'elle est photoactivée. En effet, les cellules HCT116 témoins (non traitées et non irradiées) produisent peu d'ERO (MFI = 12,63) par rapport au témoin positif TBHP (MFI = 103,66) **(Figure 73A)**. Lorsque les cellules HCT116 sont traitées avec la TPPOH libre et non irradiées, il n'y a pas plus de production d'ERO par rapport à la condition témoin (MFI = 12,08). En revanche, lorsque les cellules HCT116 sont traitées avec la TPPOH libre et irradiées, la production d'ERO est augmentée (MFI = 29,69). Lorsque les cellules HCT116 sont traitées avec la TPPOH libre-PDT en présence de NAC, la production d'ERO se retrouve à un état proche de la condition témoin (MFI = 8,06). Ces résultats sont également observés sur les cellules HT-29 **(Figure 74A)** et SW620 **(Figure 75A)** où la production d'ERO n'est augmentée que lors de la photoactivation de la TPPOH libre.

Lorsque la TPPOH est vectorisée, la production d'ERO est également activée uniquement après photoactivation. En effet, les cellules HCT116 traitées avec les TPPOH-X SNPs ne produisent que légèrement plus d'ERO (MFI = 59,35) que les cellules HCT116 témoins (MFI = 45,32) et peu par rapport au témoin positif TBHP (MFI = 661,17) **(Figure 73B)**.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

En revanche, lorsque les cellules HCT116 sont traitées avec les TPPOH-X SNPs puis photoactivées, la production d'ERO est augmentée (MFI = 87,38). Cette augmentation de production d'ERO est diminuée lorsque les cellules HCT116 sont traitées avec les TPPOH-X SNPs en présence de NAC (MFI = 29,96). Des résultats similaires sont observés sur les cellules HT-29 **(Figure 74B)** et SW620 **(Figure 75B)** où la production d'ERO n'est augmentée que lors de la photoactivation des TPPOH-X SNPs.

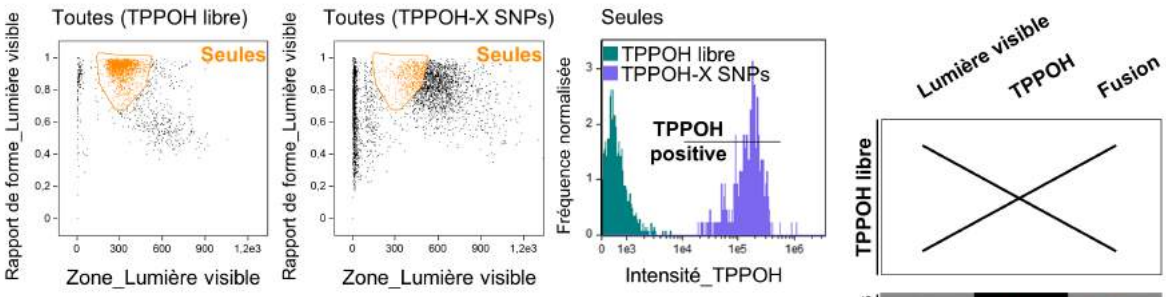
La comparaison de la production d'ERO entre la TPPOH libre-PDT et les TPPOH-X SNPs-PDT montre que quelle que soit la lignée cellulaire étudiée, le traitement avec la TPPOH libre-PDT entraîne une production d'ERO plus importante que le traitement avec les TPPOH-X SNPs-PDT. En effet, les cellules HCT116 traitées avec la TPPOH libre et photoactivées produisent plus d'ERO (MFI = 29,69) que celles traitées avec les TPPOH-X SNPs et photoactivées (MFI = 23,29) **(Figure 73C)**. La même tendance est observée sur les cellules HT-29 **(Figure 74C)** et SW620 **(Figure 75C)** avec des valeurs de production d'ERO de 58,82 et 19,46 avec la TPPOH libre-PDT contre 27,63 et 10,84 avec les TPPOH-X SNPs-PDT respectivement.

I.3. Étude de l'internalisation cellulaire

Il est connu que les porphyrines sont peu solubles dans les milieux biologiques du fait de leur forte hydrophobicité et que leur vectorisation sur des nanoparticules améliore leur biodistribution. De ce fait, la forte différence d'IC_{50} entre la TPPOH libre-PDT et les TPPOH-X SNPs-PDT dans les 3 lignées cellulaires considérées est peut-être due à une amélioration de l'internalisation cellulaire des TPPOH-X SNPs par rapport à la TPPOH libre. Une cinétique d'internalisation cellulaire aux temps 2, 6, 12 et 24 h a été réalisée permettant d'éliminer une potentielle rétention des SNPs à 24 h par rapport à l'efflux simplifié de la TPPOH libre par les cellules cancéreuses **(Figures 76-87)**.

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans du milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées avec la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs à la même concentration (1 µM en TPPOH). Après 2, 6, 12 et 24 h d'incubation, la fluorescence naturelle de la TPPOH (excitation 405 nm ; émission 650 nm) a été analysée par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS®. La sélection « TPPOH positive » a été définie arbitrairement mais de façon identique tout au long de la cinétique afin de comparer le % d'internalisation cellulaire entre la TPPOH libre et les TPPOH-X SNPs.

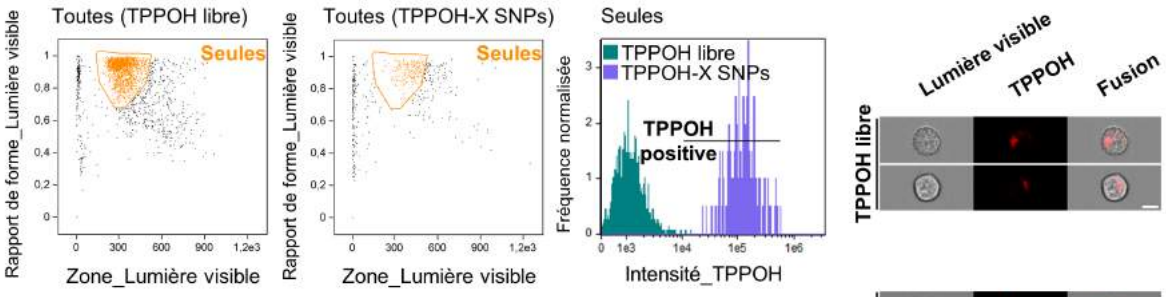
Licence CC BY-NC-ND 3.0



2 h	TPPOH libre		TPPOH-X SNPs	
Population	Nombre	% de positive	Nombre	% de positive
Seules	**1 486**	**100**	**443**	**100**
TPPOH positive	**0**	**0**	**441**	**99,5**

Figure 76 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules HCT116 après 2 h de traitement

Les cellules HCT116 ont été traitées avec la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs à la même concentration (1 µM en TPPOH). Après 2 h d'incubation, la fluorescence naturelle de la TPPOH (excitation 405 nm ; émission 650 nm) a été analysée par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS®. Les 2 premiers graphiques représentent le rapport taille/structure des cellules HCT116 selon les traitements. Après sélection de la population où les cellules sont individualisées, l'intensité de la TPPOH est analysée pour les 2 composés. Le tableau résume le nombre de cellules dans la population sélectionnée ainsi que le nombre de cellules TPPOH positive selon les traitements. La fluorescence intracellulaire de la TPPOH est montrée par des images représentatives. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

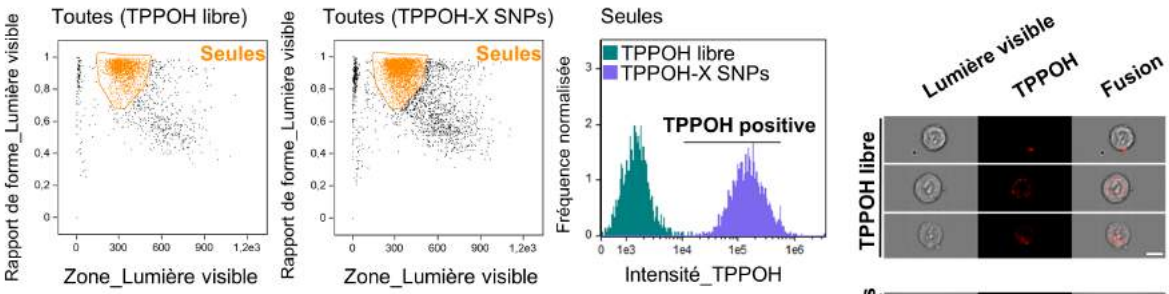


6 h	TPPOH libre		TPPOH-X SNPs	
Population	Nombre	% de positive	Nombre	% de positive
Seules	**1 568**	**100**	**201**	**100**
TPPOH positive	**2**	**0,13**	**201**	**100**

Figure 77 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules HCT116 après 6 h de traitement

Les cellules HCT116 ont été traitées avec la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs à la même concentration (1 µM en TPPOH). Après 6 h d'incubation, la fluorescence naturelle de la TPPOH (excitation 405 nm ; émission 650 nm) a été analysée par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS®. Les 2 premiers graphiques représentent le rapport taille/structure des cellules HCT116 selon les traitements. Après sélection de la population où les cellules sont individualisées, l'intensité de la TPPOH est analysée pour les 2 composés. Le tableau résume le nombre de cellules dans la population sélectionnée ainsi que le nombre de cellules TPPOH positive selon les traitements. La fluorescence intracellulaire de la TPPOH est montrée par des images représentatives. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

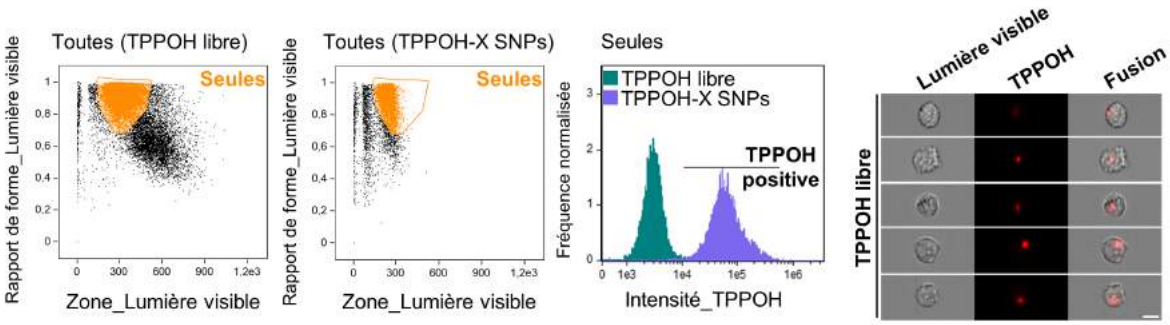
Licence CC BY-NC-ND 3.0



12 h	TPPOH libre		TPPOH-X SNPs	
Population	Nombre	% de positive	Nombre	% de positive
Seules	**1 562**	**100**	**2 835**	**100**
TPPOH positive	**3**	**0,19**	**2 787**	**98,3**

Figure 78 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules HCT116 après 12 h de traitement

Les cellules HCT116 ont été traitées avec la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs à la même concentration (1 µM en TPPOH). Après 12 h d'incubation, la fluorescence naturelle de la TPPOH (excitation 405 nm ; émission 650 nm) a été analysée par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS®. Les 2 premiers graphiques représentent le rapport taille/structure des cellules HCT116 selon les traitements. Après sélection de la population où les cellules sont individualisées, l'intensité de la TPPOH est analysée pour les 2 composés. Le tableau résume le nombre de cellules dans la population sélectionnée ainsi que le nombre de cellules TPPOH positive selon les traitements. La fluorescence intracellulaire de la TPPOH est montrée par des images représentatives. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

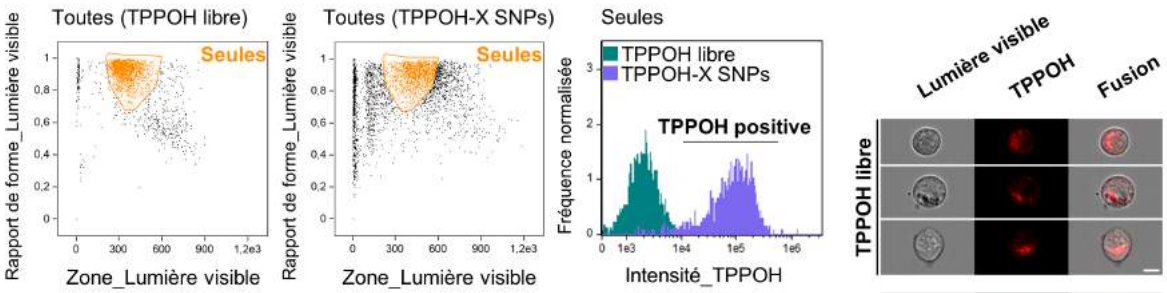


24 h	TPPOH libre		TPPOH-X SNPs	
Population	Nombre	% de positive	Nombre	% de positive
Seules	**8 799**	**100**	**6 435**	**100**
TPPOH positive	**47**	**0,53**	**6 390**	**99,3**

Figure 79 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules HCT116 après 24 h de traitement

Les cellules HCT116 ont été traitées avec la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs à la même concentration (1 µM en TPPOH). Après 24 h d'incubation, la fluorescence naturelle de la TPPOH (excitation 405 nm ; émission 650 nm) a été analysée par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS®. Les 2 premiers graphiques représentent le rapport taille/structure des cellules HCT116 selon les traitements. Après sélection de la population où les cellules sont individualisées, l'intensité de la TPPOH est analysée pour les 2 composés. Le tableau résume le nombre de cellules dans la population sélectionnée ainsi que le nombre de cellules TPPOH positive selon les traitements. La fluorescence intracellulaire de la TPPOH est montrée par des images représentatives. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

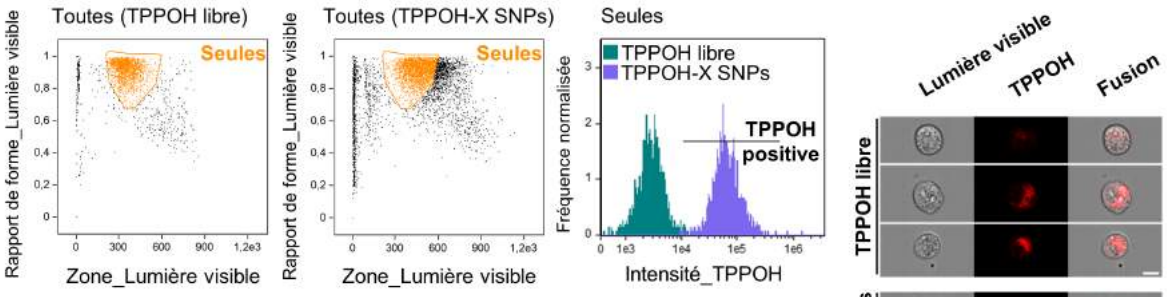
Licence CC BY-NC-ND 3.0



2 h	TPPOH libre		TPPOH-X SNPs	
Population	Nombre	% de positive	Nombre	% de positive
Seules	**1 736**	**100**	**1 381**	**100**
TPPOH positive	**11**	**0,63**	**1 339**	**97**

Figure 80 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules HT-29 après 2 h de traitement

Les cellules HT-29 ont été traitées avec la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs à la même concentration (1 µM en TPPOH). Après 2 h d'incubation, la fluorescence naturelle de la TPPOH (excitation 405 nm ; émission 650 nm) a été analysée par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS®. Les 2 premiers graphiques représentent le rapport taille/structure des cellules HT-29 selon les traitements. Après sélection de la population où les cellules sont individualisées, l'intensité de la TPPOH est analysée pour les 2 composés. Le tableau résume le nombre de cellules dans la population sélectionnée ainsi que le nombre de cellules TPPOH positive selon les traitements. La fluorescence intracellulaire de la TPPOH est montrée par des images représentatives. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

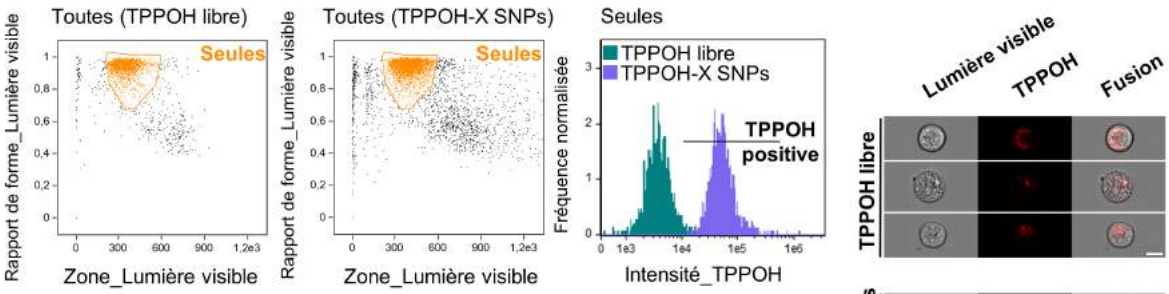


6 h	TPPOH libre		TPPOH-X SNPs	
Population	Nombre	% de positive	Nombre	% de positive
Seules	**1 531**	**100**	**1 668**	**100**
TPPOH positive	**17**	**1,11**	**1 662**	**99,6**

Figure 81 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules HT-29 après 6 h de traitement

Les cellules HT-29 ont été traitées avec la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs à la même concentration (1 µM en TPPOH). Après 6 h d'incubation, la fluorescence naturelle de la TPPOH (excitation 405 nm ; émission 650 nm) a été analysée par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS®. Les 2 premiers graphiques représentent le rapport taille/structure des cellules HT-29 selon les traitements. Après sélection de la population où les cellules sont individualisées, l'intensité de la TPPOH est analysée pour les 2 composés. Le tableau résume le nombre de cellules dans la population sélectionnée ainsi que le nombre de cellules TPPOH positive selon les traitements. La fluorescence intracellulaire de la TPPOH est montrée par des images représentatives. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

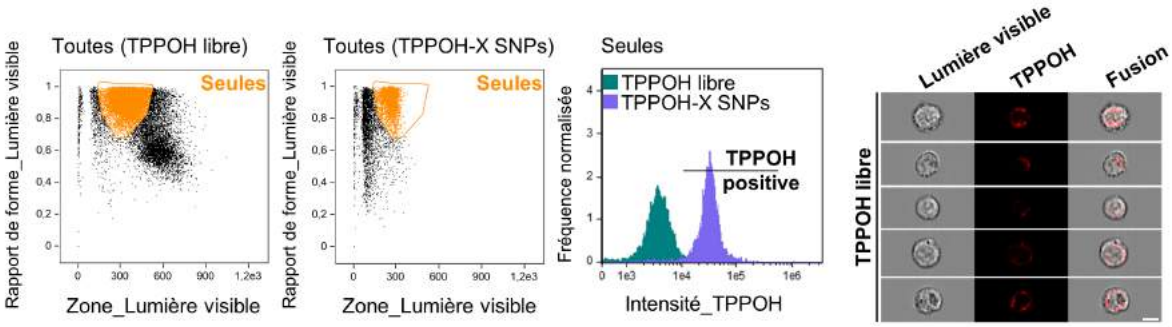
Licence CC BY-NC-ND 3.0



12 h	TPPOH libre		TPPOH-X SNPs	
Population	Nombre	% de positive	Nombre	% de positive
Seules	**1 511**	**100**	**1 682**	**100**
TPPOH positive	**28**	**1,85**	**1 680**	**99,9**

Figure 82 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules HT-29 après 12 h de traitement

Les cellules HT-29 ont été traitées avec la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs à la même concentration (1 µM en TPPOH). Après 12 h d'incubation, la fluorescence naturelle de la TPPOH (excitation 405 nm ; émission 650 nm) a été analysée par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS®. Les 2 premiers graphiques représentent le rapport taille/structure des cellules HT-29 selon les traitements. Après sélection de la population où les cellules sont individualisées, l'intensité de la TPPOH est analysée pour les 2 composés. Le tableau résume le nombre de cellules dans la population sélectionnée ainsi que le nombre de cellules TPPOH positive selon les traitements. La fluorescence intracellulaire de la TPPOH est montrée par des images représentatives. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

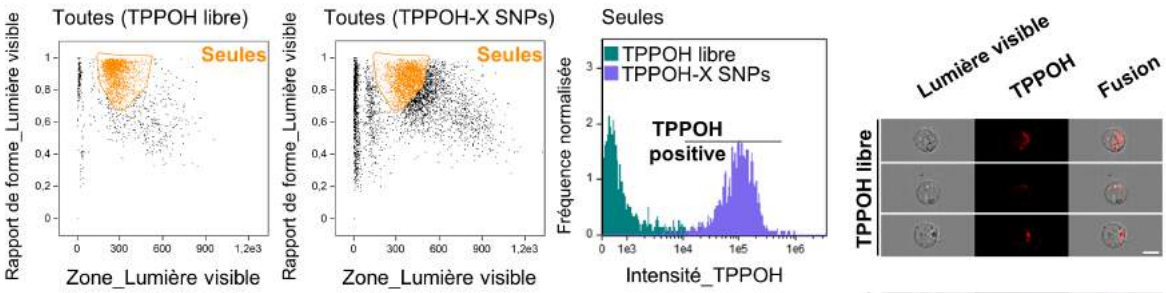


24 h	TPPOH libre		TPPOH-X SNPs	
Population	Nombre	% de positive	Nombre	% de positive
Seules	**11 854**	**100**	**4 117**	**100**
TPPOH positive	**275**	**2,32**	**4 043**	**98,2**

Figure 83 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules HT-29 après 24 h de traitement

Les cellules HT-29 ont été traitées avec la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs à la même concentration (1 µM en TPPOH). Après 24 h d'incubation, la fluorescence naturelle de la TPPOH (excitation 405 nm ; émission 650 nm) a été analysée par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS®. Les 2 premiers graphiques représentent le rapport taille/structure des cellules HT-29 selon les traitements. Après sélection de la population où les cellules sont individualisées, l'intensité de la TPPOH est analysée pour les 2 composés. Le tableau résume le nombre de cellules dans la population sélectionnée ainsi que le nombre de cellules TPPOH positive selon les traitements. La fluorescence intracellulaire de la TPPOH est montrée par des images représentatives. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

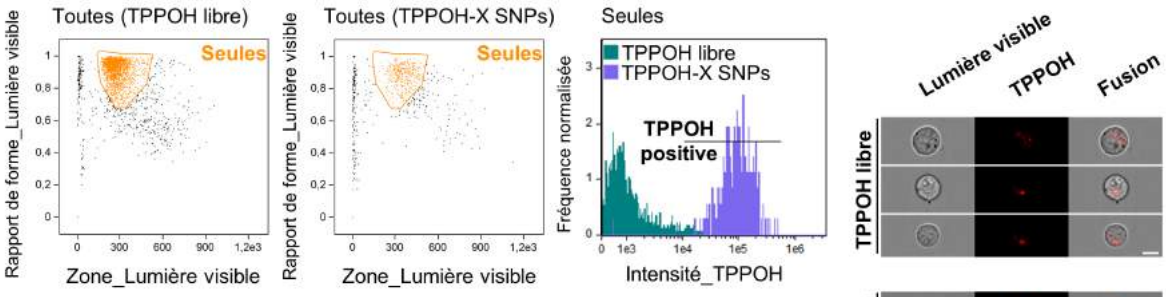
Licence CC BY-NC-ND 3.0



2 h	TPPOH libre		TPPOH-X SNPs	
Population	Nombre	% de positive	Nombre	% de positive
Seules	**1 597**	**100**	**1 761**	**100**
TPPOH positive	**24**	**1,5**	**1 747**	**99,2**

Figure 84 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules SW620 après 2 h de traitement

Les cellules SW620 ont été traitées avec la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs à la même concentration (1 µM en TPPOH). Après 2 h d'incubation, la fluorescence naturelle de la TPPOH (excitation 405 nm ; émission 650 nm) a été analysée par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS®. Les 2 premiers graphiques représentent le rapport taille/structure des cellules SW620 selon les traitements. Après sélection de la population où les cellules sont individualisées, l'intensité de la TPPOH est analysée pour les 2 composés. Le tableau résume le nombre de cellules dans la population sélectionnée ainsi que le nombre de cellules TPPOH positive selon les traitements. La fluorescence intracellulaire de la TPPOH est montrée par des images représentatives. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

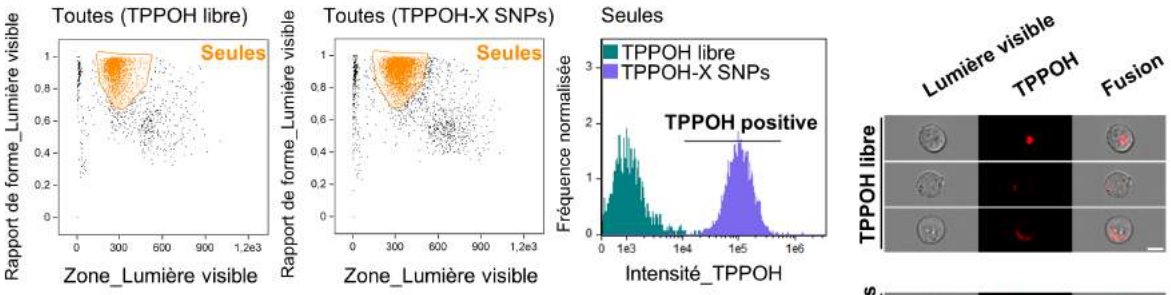


6 h	TPPOH libre		TPPOH-X SNPs	
Population	Nombre	% de positive	Nombre	% de positive
Seules	**1 737**	**100**	**357**	**100**
TPPOH positive	**48**	**2,76**	**356**	**99,7**

Figure 85 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules SW620 après 6 h de traitement

Les cellules SW620 ont été traitées avec la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs à la même concentration (1 µM en TPPOH). Après 6 h d'incubation, la fluorescence naturelle de la TPPOH (excitation 405 nm ; émission 650 nm) a été analysée par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS®. Les 2 premiers graphiques représentent le rapport taille/structure des cellules SW620 selon les traitements. Après sélection de la population où les cellules sont individualisées, l'intensité de la TPPOH est analysée pour les 2 composés. Le tableau résume le nombre de cellules dans la population sélectionnée ainsi que le nombre de cellules TPPOH positive selon les traitements. La fluorescence intracellulaire de la TPPOH est montrée par des images représentatives. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

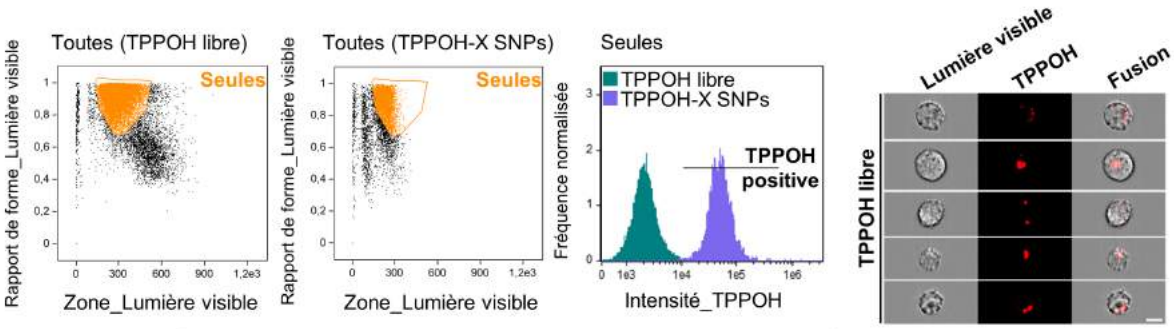
Licence CC BY-NC-ND 3.0



12 h	TPPOH libre		TPPOH-X SNPs	
Population	Nombre	% de positive	Nombre	% de positive
Seules	**1 674**	**100**	**3 272**	**100**
TPPOH positive	**6**	**0,36**	**3 266**	**99,8**

Figure 86 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules SW620 après 12 h de traitement

Les cellules SW620 ont été traitées avec la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs à la même concentration (1 µM en TPPOH). Après 12 h d'incubation, la fluorescence naturelle de la TPPOH (excitation 405 nm ; émission 650 nm) a été analysée par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS®. Les 2 premiers graphiques représentent le rapport taille/structure des cellules SW620 selon les traitements. Après sélection de la population où les cellules sont individualisées, l'intensité de la TPPOH est analysée pour les 2 composés. Le tableau résume le nombre de cellules dans la population sélectionnée ainsi que le nombre de cellules TPPOH positive selon les traitements. La fluorescence intracellulaire de la TPPOH est montrée par des images représentatives. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.



24 h	TPPOH libre		TPPOH-X SNPs	
Population	Nombre	% de positive	Nombre	% de positive
Seules	**10 359**	**100**	**4 134**	**100**
TPPOH positive	**93**	**0,9**	**4 126**	**99,8**

Figure 87 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules SW620 après 24 h de traitement

Les cellules SW620 ont été traitées avec la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs à la même concentration (1 µM en TPPOH). Après 24 h d'incubation, la fluorescence naturelle de la TPPOH (excitation 405 nm ; émission 650 nm) a été analysée par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS®. Les 2 premiers graphiques représentent le rapport taille/structure des cellules SW620 selon les traitements. Après sélection de la population où les cellules sont individualisées, l'intensité de la TPPOH est analysée pour les 2 composés. Le tableau résume le nombre de cellules dans la population sélectionnée ainsi que le nombre de cellules TPPOH positive selon les traitements. La fluorescence intracellulaire de la TPPOH est montrée par des images représentatives. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Ces résultats montrent tout d'abord une internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs démontrée par la fluorescence rouge dans les cellules. De plus, ils indiquent que, quelle que soit la lignée cellulaire concernée, l'internalisation cellulaire est beaucoup plus importante lorsque la TPPOH est vectorisée. En effet sur les cellules HCT116, après 2 h de traitement à la même concentration, 99,5% des cellules présentent une fluorescence intracellulaire avec les TPPOH-X SNPs alors qu'aucune cellule n'en présente avec la TPPOH libre **(Figure 76)**. Il est possible que la TPPOH libre ait besoin d'un temps plus important pour pénétrer les cellules. Cependant, la même tendance est observée après 6 h de traitement avec des valeurs de 100% pour les TPPOH-X SNPs contre 0,13% pour la TPPOH libre **(Figure 77)**. C'est également le cas après 12 h **(Figure 78)** et 24 h **(Figure 79)** de traitement où 98,3% et 99,3% des cellules présentent une fluorescence intracellulaire avec les TPPOH-X SNPs contre 0,19% et 0,53% avec la TPPOH libre respectivement. Des résultats similaires sont retrouvés au niveau des cellules HT-29 **(Figures 80-83)** et des cellules SW620 **(Figures 84-87)** où quel que soit le temps de traitement considéré, plus de 97% des cellules présentent une fluorescence intracellulaire de la TPPOH lors du traitement avec les TPPOH-X SNPs contre moins de 3% lors du traitement avec la TPPOH libre.

I.4. Étude de l'internalisation et de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs par MET

Afin de confirmer l'internalisation cellulaire des TPPOH-X SNPs observée précédemment et de déterminer leur localisation cellulaire, des études par MET ont été réalisées **(Figures 88-90)**.

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans du milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été récupérées, préparées et analysées par MET.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

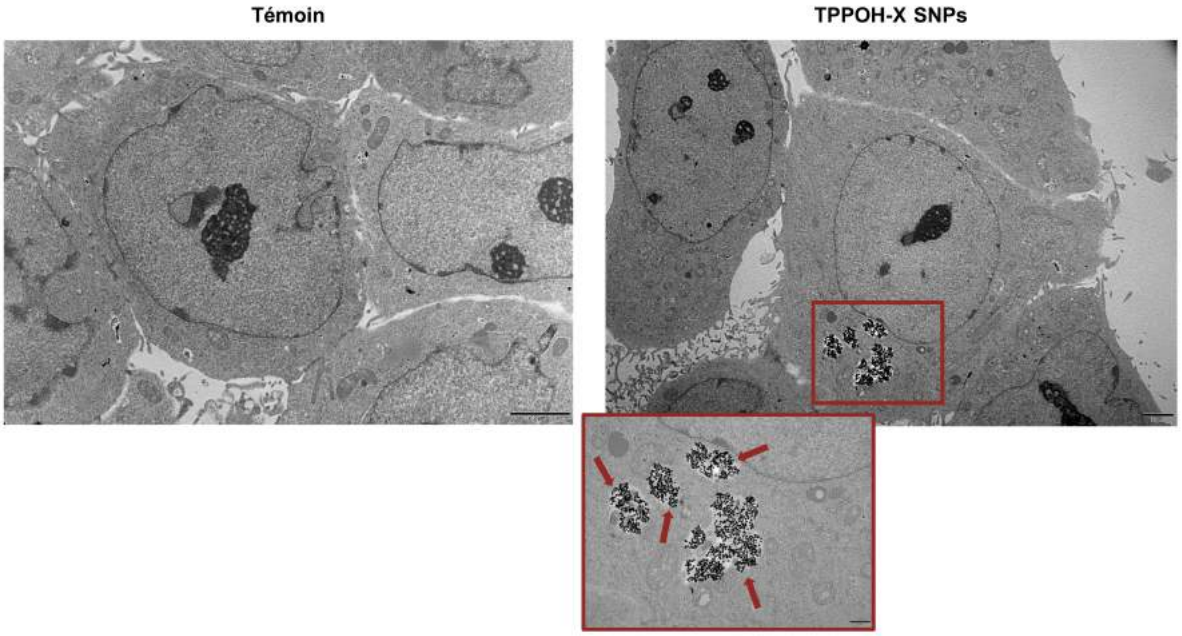


Figure 88 : étude en MET de l'internalisation et de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs sur les cellules HCT116

Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée. Après préparation des cellules, elles ont été analysées par MET et des images représentatives sont visualisées. Les flèches rouges indiquent la présence intracellulaire de SNPs. La barre d'échelle noire représente 2 µm excepté pour le zoom de la condition TPPOH-X SNPs où elle représente 1 µm.

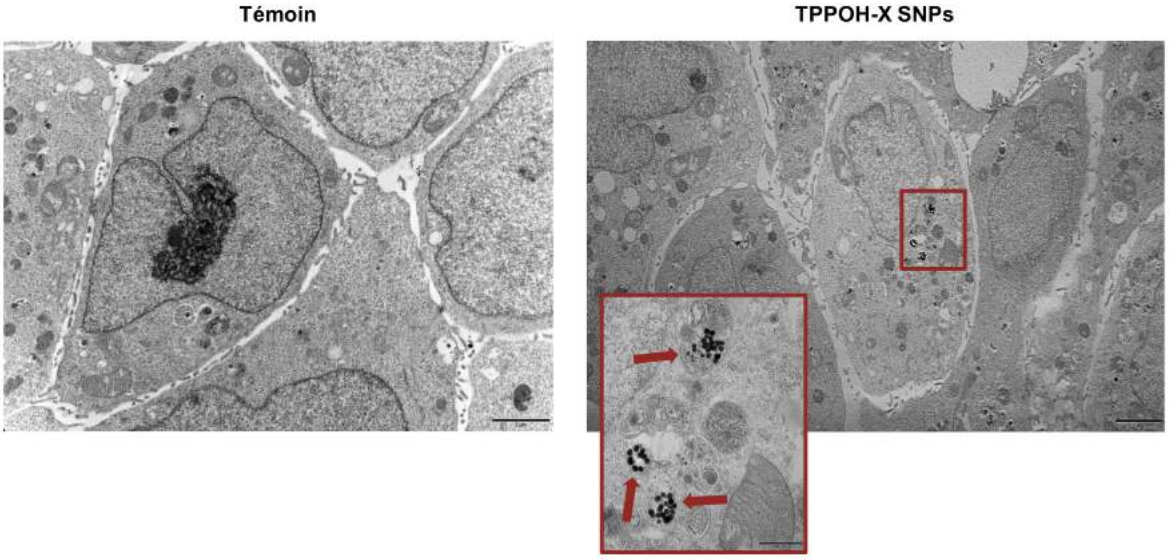


Figure 89 : étude en MET de l'internalisation et de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs sur les cellules HT-29

Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée. Après préparation des cellules, elles ont été analysées par MET et des images représentatives sont visualisées. Les flèches rouges indiquent la présence intracellulaire de SNPs. La barre d'échelle noire représente 2 µm excepté pour le zoom de la condition TPPOH-X SNPs où elle représente 500 nm.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

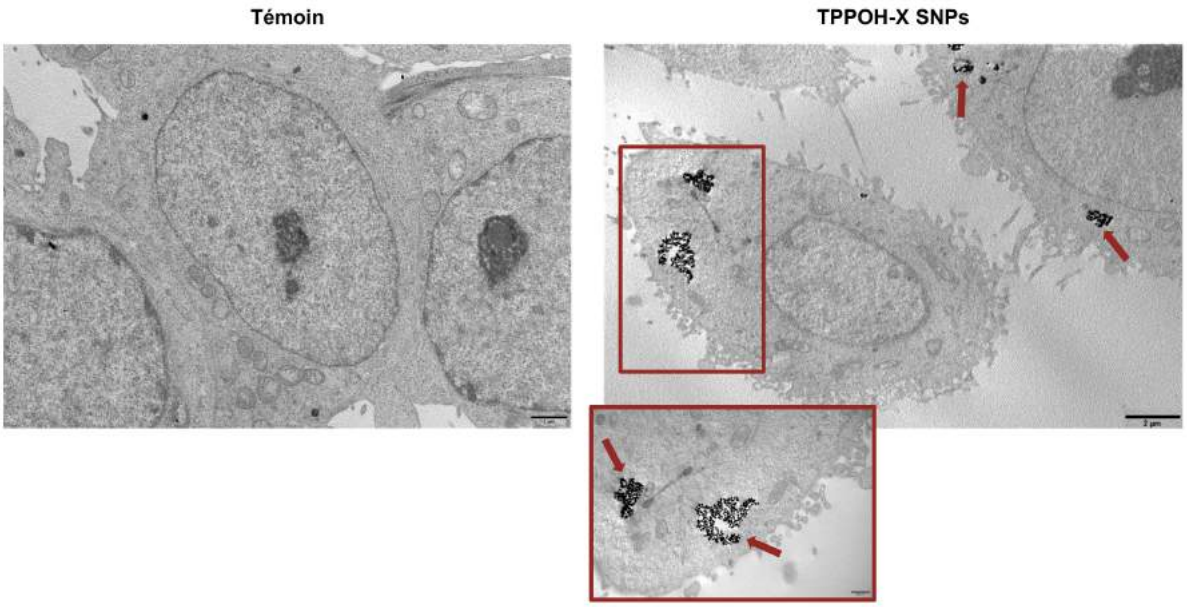


Figure 90 : étude en MET de l'internalisation et de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs sur les cellules SW620

Les cellules SW620 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée. Après préparation des cellules, elles ont été analysées par MET et des images représentatives sont visualisées. Les flèches rouges indiquent la présence intracellulaire de SNPs. La barre d'échelle noire représente 1 µm pour la condition témoin, 2 µm pour la condition TPPOH-X SNPs et 500 nm pour le zoom de la condition TPPOH-X SNPs.

Que ce soit dans les cellules HCT116 **(Figure 88)**, HT-29 **(Figure 89)** ou SW620 **(Figure 90)**, ces résultats montrent tout d'abord que les TPPOH-X SNPs pénètrent bien dans les cellules. De plus, l'internalisation cellulaire des TPPOH-X SNPs ne semble pas induire de changement morphologique des cellules par rapport à la condition témoin. Affirmation qui conforte l'absence d'effet sur la viabilité cellulaire des TPPOH-X SNPs non photoactivées. Enfin, la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs ne semble pas être au niveau des mitochondries mais plus au niveau des lysosomes comme l'indique le zoom sur les cellules HT-29 **(Figure 89)**.

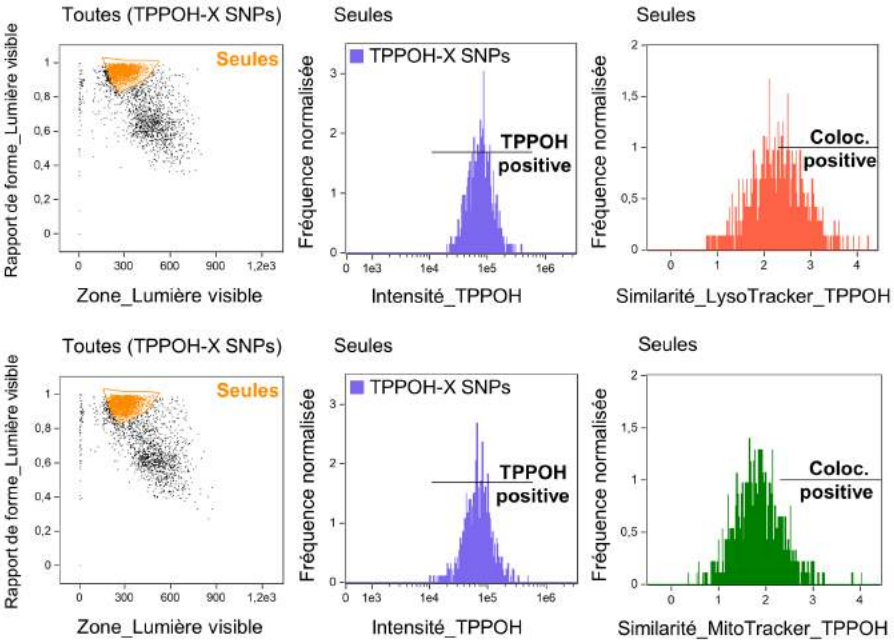
I.5. Étude de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs

Afin de confirmer la localisation des TPPOH-X SNPs au niveau lysosomal, des analyses de localisation cellulaire ont été réalisées par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® **(Figures 91-93)** et par microscopie confocale **(Figures 94-96)**.

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans du milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées avec les TPPOH-X SNPs à 1 µM. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été co-traitées avec du LysoTracker ou du MitoTracker. Les fluorescences de la TPPOH, du LysoTracker (excitation 578 nm ; émission 603 nm) et du MitoTracker (excitation 490 nm ; émission 516 nm) ont été analysées et la co-localisation entre TPPOH et Lyso/MitoTracker a été déterminée grâce au coefficient de corrélation de Pearson.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Pour les analyses en microscopie confocale, les cellules ont été cultivées, traitées et co-traitées comme décrit précédemment mais elles ont été transférées dans des Lab-Tek afin de pouvoir être analysées par microscopie.



24 h	LysoTracker		MitoTracker	
Population	Nombre	% de positive	Nombre	% de positive
Seules	**719**	**100**	**929**	**100**
Coloc. positive	**357**	**49,7**	**139**	**15**

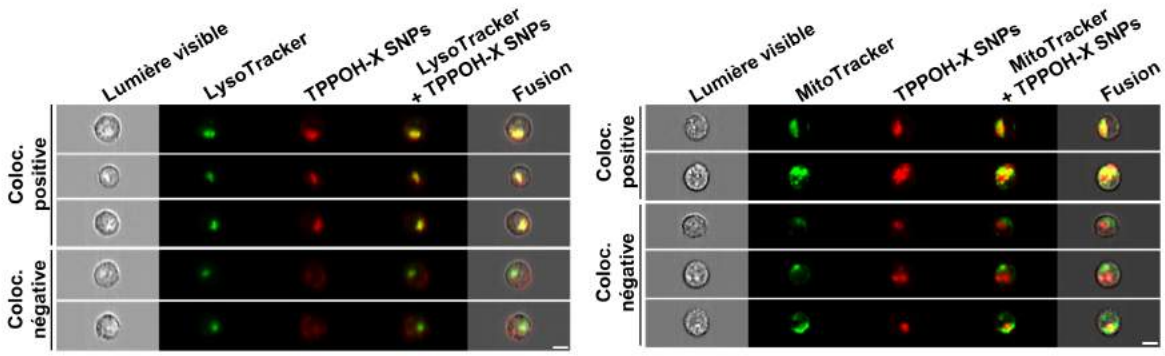
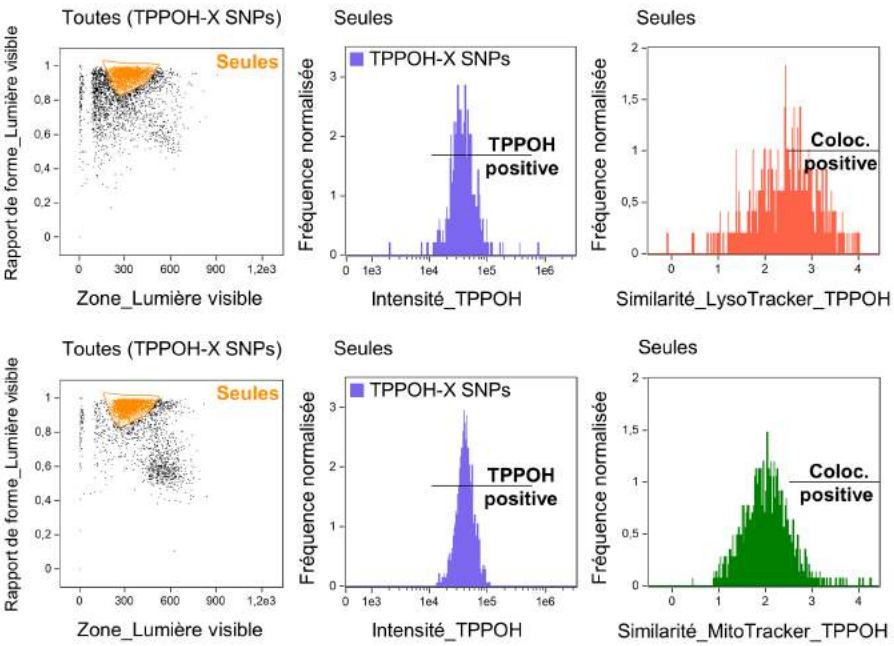


Figure 91 : étude de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® sur les cellules HCT116

Les cellules HCT116 ont été traitées avec les TPPOH-X SNPs à 1 µM. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été co-traitées avec du LysoTracker ou du MitoTracker. Les fluorescences de la TPPOH, du LysoTracker (excitation 578 nm ; émission 603 nm) et du MitoTracker (excitation 490 nm ; émission 516 nm) ont été analysées par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® et la co-localisation entre TPPOH et Lyso/MitoTracker a été déterminée grâce au coefficient de corrélation de Pearson. Le 1er graphique représente le rapport taille/structure des cellules HCT116. Le 2nd graphique représente l'intensité de la TPPOH après sélection de la population où les cellules sont individualisées. Enfin, le 3ème graphique représente la similarité des cellules de la population sélectionnée avec le Lyso ou le MitoTracker. Le tableau résume le nombre de cellules dans la population sélectionnée ainsi que le nombre de cellules TPPOH et Lyso/MitoTracker positives. Des images représentatives montrent les différentes conditions de co-localisation. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

Licence CC BY-NC-ND 3.0



24 h	LysoTracker		MitoTracker	
Population	Nombre	% de positive	Nombre	% de positive
Seules	**490**	**100**	**1 421**	**100**
Coloc. positive	**249**	**50,8**	**171**	**12**

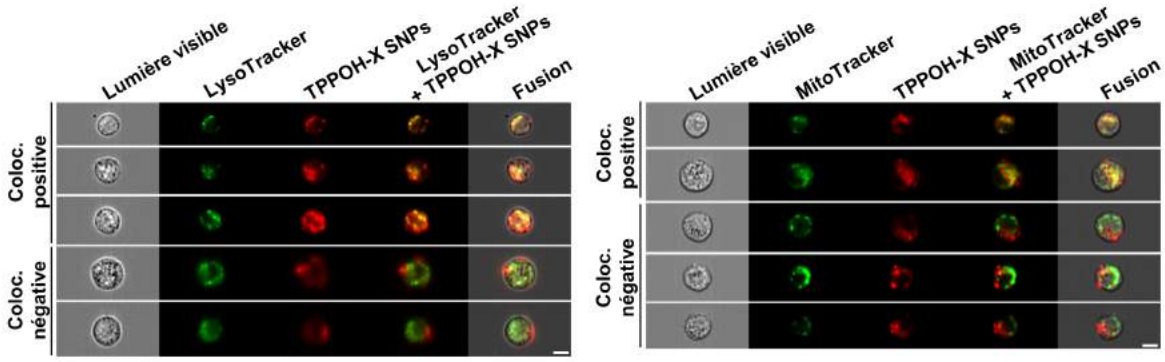
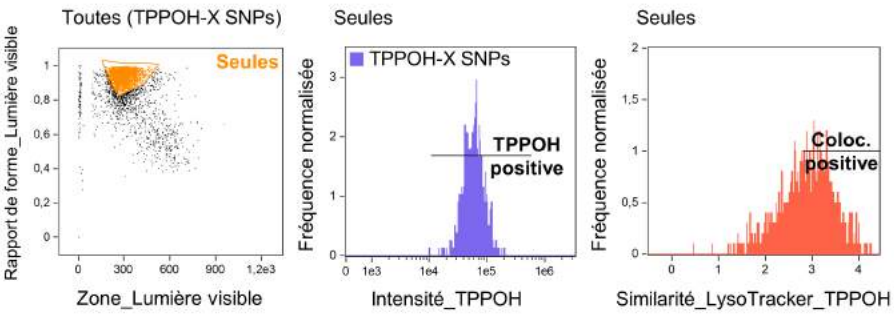
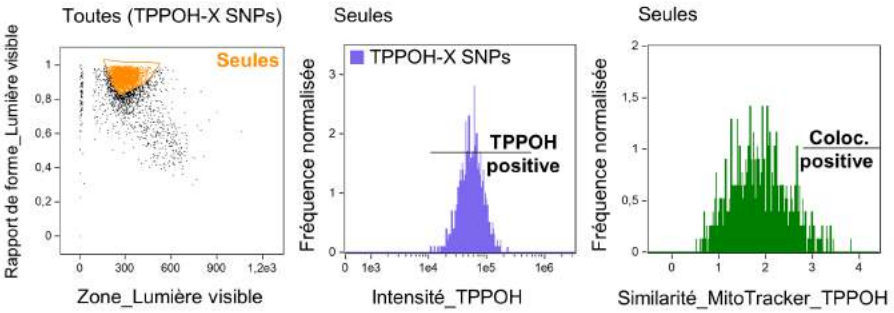


Figure 92 : étude de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® sur les cellules HT-29

Les cellules HT-29 ont été traitées avec les TPPOH-X SNPs à 1 µM. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été co-traitées avec du LysoTracker ou du MitoTracker. Les fluorescences de la TPPOH, du LysoTracker (excitation 578 nm ; émission 603 nm) et du MitoTracker (excitation 490 nm ; émission 516 nm) ont été analysées par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® et la co-localisation entre TPPOH et Lyso/MitoTracker a été déterminée grâce au coefficient de corrélation de Pearson. Le 1er graphique représente le rapport taille/structure des cellules HT-29. Le 2nd graphique représente l'intensité de la TPPOH après sélection de la population où les cellules sont individualisées. Enfin, le 3ème graphique représente la similarité des cellules de la population sélectionnée avec le Lyso ou le MitoTracker. Le tableau résume le nombre de cellules dans la population sélectionnée ainsi que le nombre de cellules TPPOH et Lyso/MitoTracker positives. Des images représentatives montrent les différentes conditions de co-localisation. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

Licence CC BY-NC-ND 3.0





24 h	LysoTracker		MitoTracker	
Population	Nombre	% de positive	Nombre	% de positive
Seules	**997**	**100**	**776**	**100**
Coloc. positive	**591**	**59.3**	**42**	**5.4**

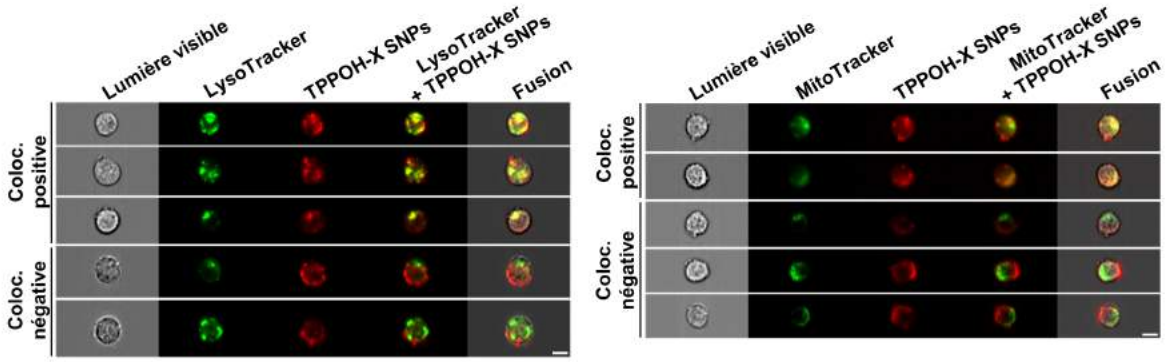


Figure 93 : étude de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® sur les cellules SW620

Les cellules SW620 ont été traitées avec les TPPOH-X SNPs à 1 µM. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été co-traitées avec du LysoTracker ou du MitoTracker. Les fluorescences de la TPPOH, du LysoTracker (excitation 578 nm ; émission 603 nm) et du MitoTracker (excitation 490 nm ; émission 516 nm) ont été analysées par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® et la co-localisation entre TPPOH et Lyso/MitoTracker a été déterminée grâce au coefficient de corrélation de Pearson. Le 1er graphique représente le rapport taille/structure des cellules SW620. Le 2nd graphique représente l'intensité de la TPPOH après sélection de la population où les cellules sont individualisées. Enfin, le 3ème graphique représente la similarité des cellules de la population sélectionnée avec le Lyso ou le MitoTracker. Le tableau résume le nombre de cellules dans la population sélectionnée ainsi que le nombre de cellules TPPOH et Lyso/MitoTracker positives. Des images représentatives montrent les différentes conditions de co-localisation. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

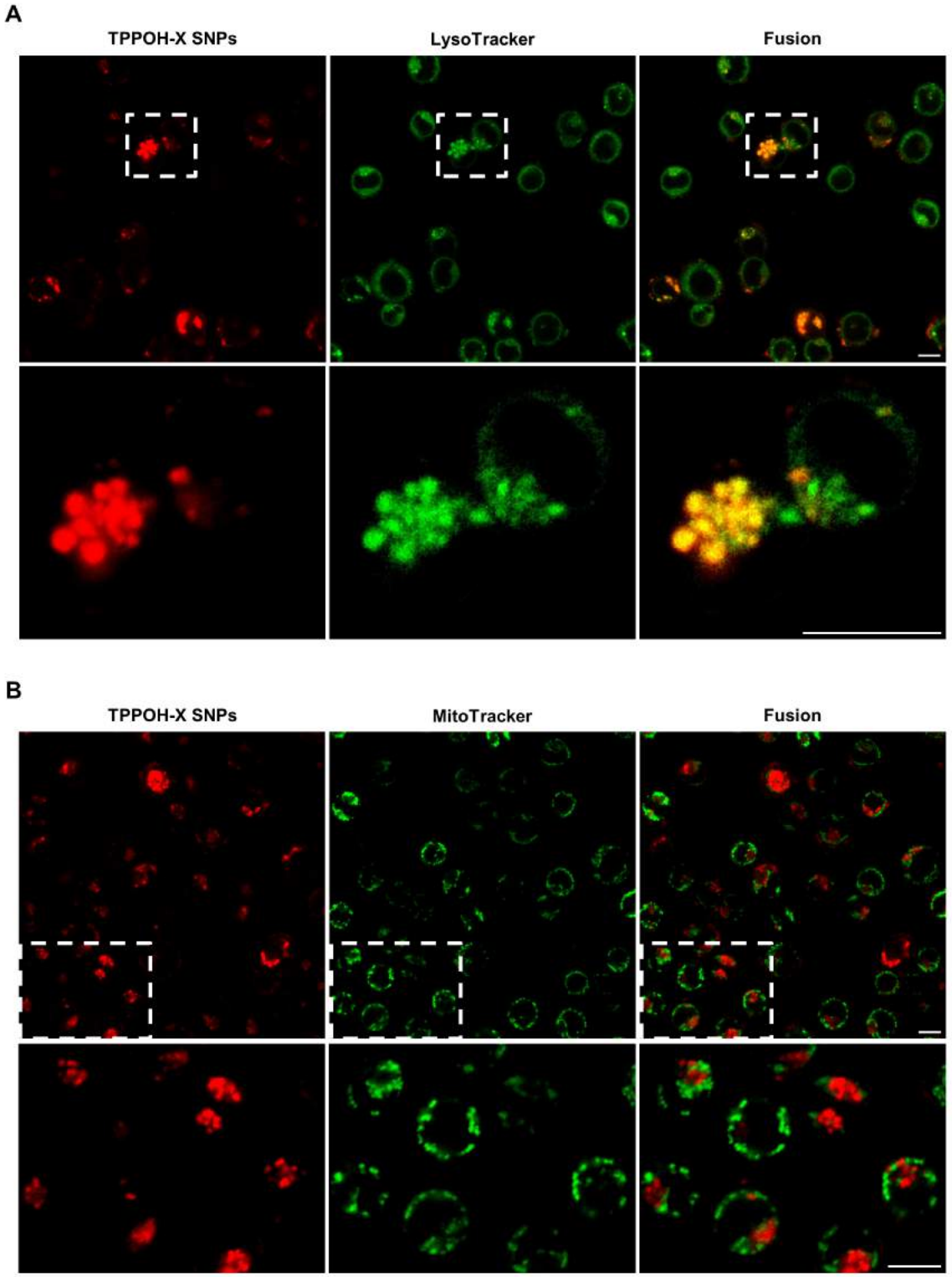


Figure 94 : étude de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs par microscopie confocale sur les cellules HCT116

A : Les cellules HCT116 ont été traitées avec les TPPOH-X SNPs à 1 µM. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été co-traitées avec du LysoTracker. **B** : Les cellules HCT116 ont été traitées avec les TPPOH-X SNPs à 1 µM. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été co-traitées avec du MitoTracker. Les fluorescences de la TPPOH, du LysoTracker (excitation 578 nm ; émission 603 nm) et du MitoTracker (excitation 490 nm ; émission 516 nm) ont été analysées par microscopie confocale et la co-localisation entre TPPOH et Lyso/MitoTracker a été déterminée grâce au logiciel de traitement d'images ImageJ. Des images représentatives montrent les différentes conditions de co-localisation. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

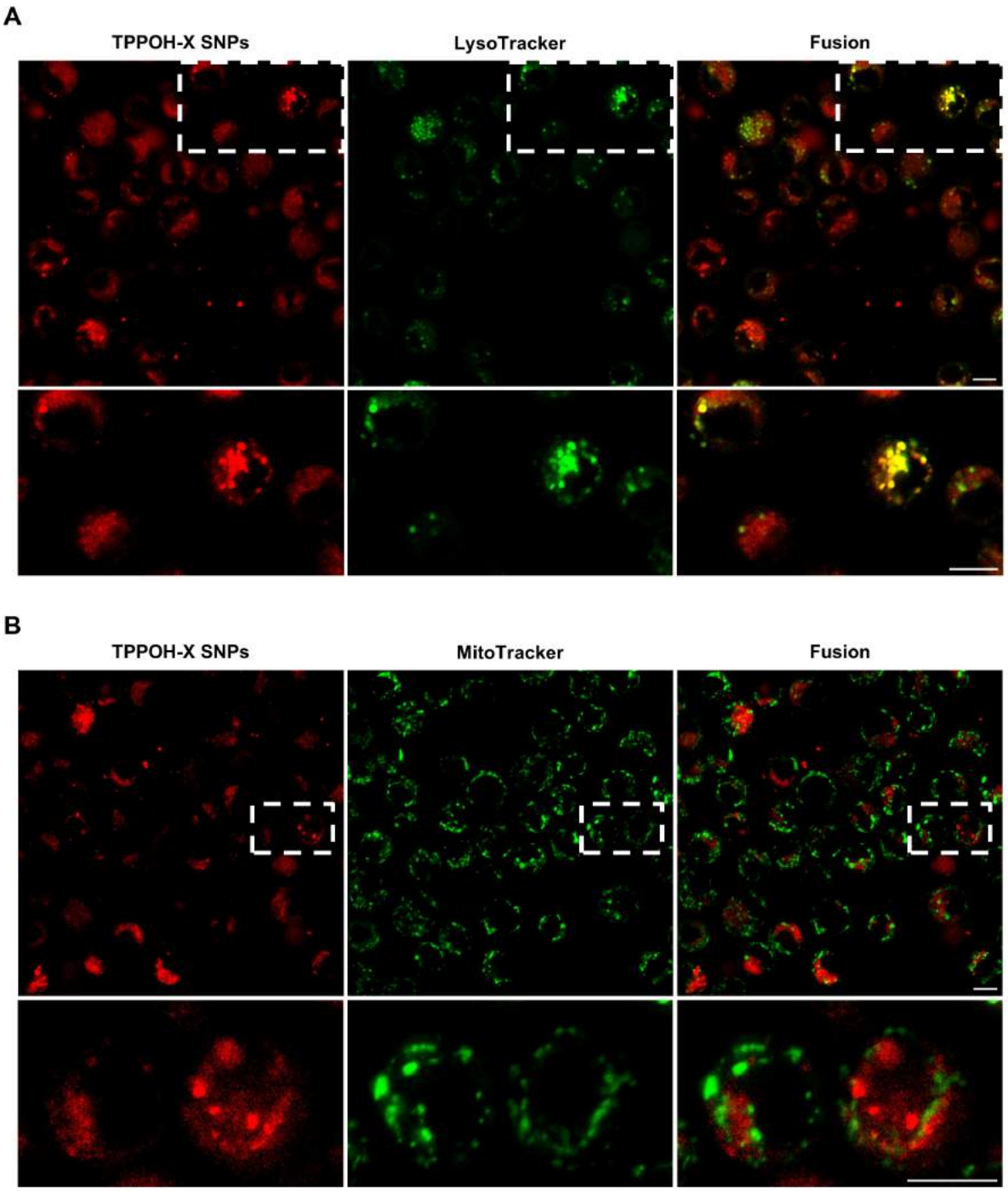


Figure 95 : étude de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs par microscopie confocale sur les cellules HT-29

A : Les cellules HT-29 ont été traitées avec les TPPOH-X SNPs à 1 µM. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été co-traitées avec du LysoTracker. **B** : Les cellules HT-29 ont été traitées avec les TPPOH-X SNPs à 1 µM. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été co-traitées avec du MitoTracker. Les fluorescences de la TPPOH, du LysoTracker (excitation 578 nm ; émission 603 nm) et du MitoTracker (excitation 490 nm ; émission 516 nm) ont été analysées par microscopie confocale et la co-localisation entre TPPOH et Lyso/MitoTracker a été déterminée grâce au logiciel de traitement d'images ImageJ. Des images représentatives montrent les différentes conditions de co-localisation. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

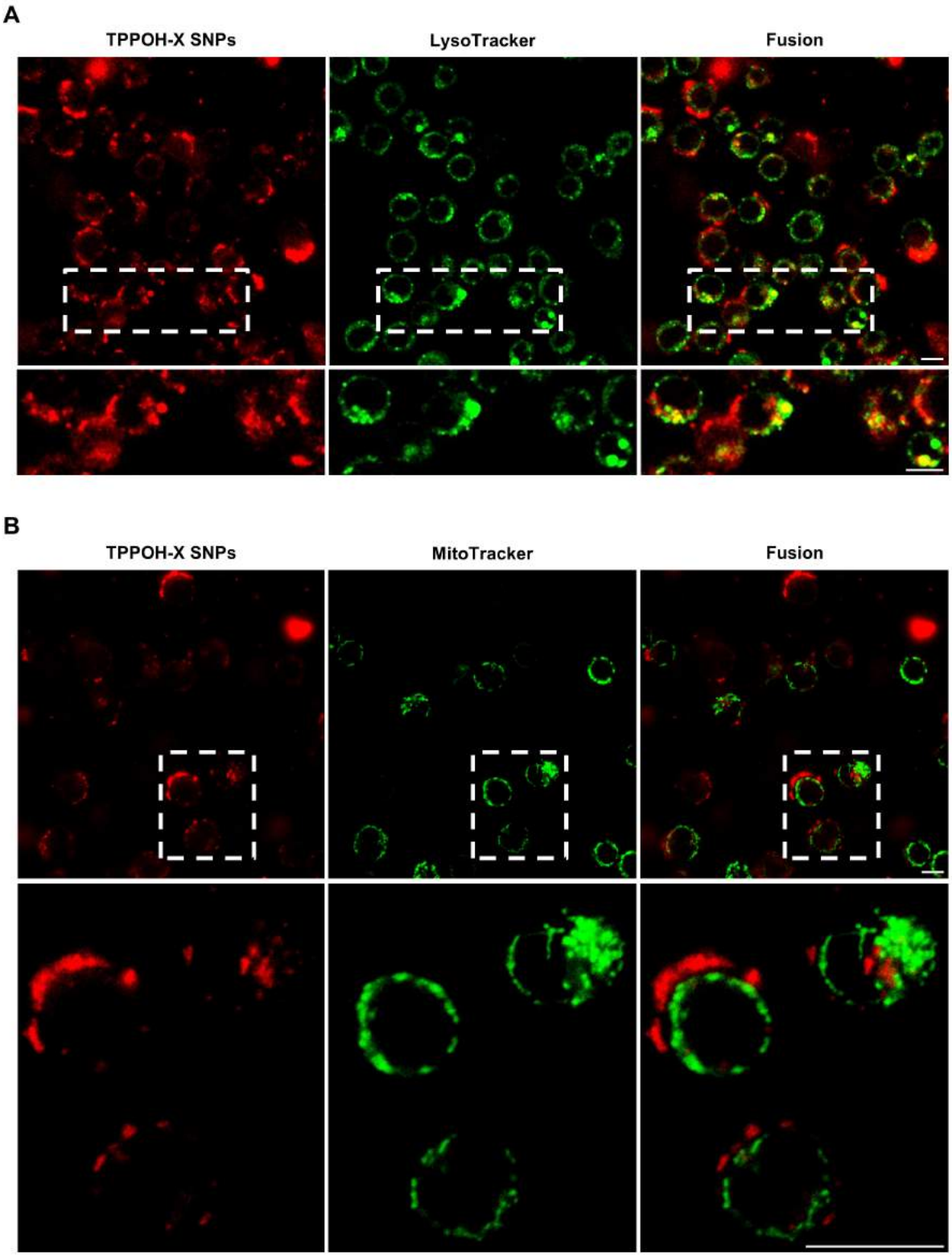


Figure 96 : étude de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs par microscopie confocale sur les cellules SW620

A : Les cellules SW620 ont été traitées avec les TPPOH-X SNPs à 1 µM. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été co-traitées avec du LysoTracker. **B** : Les cellules SW620 ont été traitées avec les TPPOH-X SNPs à 1 µM. Après 24 h d'incubation, les cellules ont été co-traitées avec du MitoTracker. Les fluorescences de la TPPOH, du LysoTracker (excitation 578 nm ; émission 603 nm) et du MitoTracker (excitation 490 nm ; émission 516 nm) ont été analysées par microscopie confocale et la co-localisation entre TPPOH et Lyso/MitoTracker a été déterminée grâce au logiciel de traitement d'images ImageJ. Des images représentatives montrent les différentes conditions de co-localisation. La barre d'échelle blanche représente 10 µm.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Ces résultats montrent que les TPPOH-X SNPs sont préférentiellement localisées dans les lysosomes plutôt que dans les mitochondries comme envisagé après l'analyse de localisation par MET. En effet, sur les cellules HCT116, les TPPOH-X SNPs sont co-localisées avec les lysosomes dans 49,7% des cellules alors qu'elles ne sont co-localisées avec les mitochondries que dans seulement 15% des cellules **(Figure 91)**. Ces résultats sont confirmés par l'analyse de la co-localisation des TPPOH-X SNPs par microscopie confocale **(Figure 94)**. En effet, lors de la fusion des 2 fluorescences rouge (TPPOH) et verte (Lyso/MitoTracker), l'apparition d'une couleur jaune est synonyme de co-localisation. Cette co-localisation est uniquement retrouvée au niveau du LysoTracker **(Figure 94A)** et non du MitoTracker **(Figure 94B)**. Des résultats similaires sont retrouvés sur les cellules HT-29 **(Figure 92)** et SW620 **(Figure 93)**, où les TPPOH-X SNPs sont co-localisées avec les lysosomes dans 50,8% et 59,3% des cellules alors qu'elles ne sont co-localisées avec les mitochondries que dans seulement 12% et 5,4% des cellules respectivement. Les analyses par microscopie confocale sur les cellules HT-29 **(Figure 95)** et SW620 **(Figure 96)** montrent également une co-localisation des TPPOH-X SNPs avec les lysosomes.

I.6. Étude du potentiel membranaire mitochondrial

Afin de déterminer le processus de mort cellulaire induit par les TPPOH-X SNPs-PDT, le $\Delta\Psi m$ a été évalué par analyse en cytométrie en flux **(Figures 97-99)**. En effet, la chute du $\Delta\Psi m$ est considérée comme un événement précoce du processus apoptotique.

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans du milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Après 24 h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol puis les cellules ont été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont ensuite été marquées avec la sonde JC-1 puis le $\Delta\Psi m$ a été estimé par analyse en cytométrie en flux.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

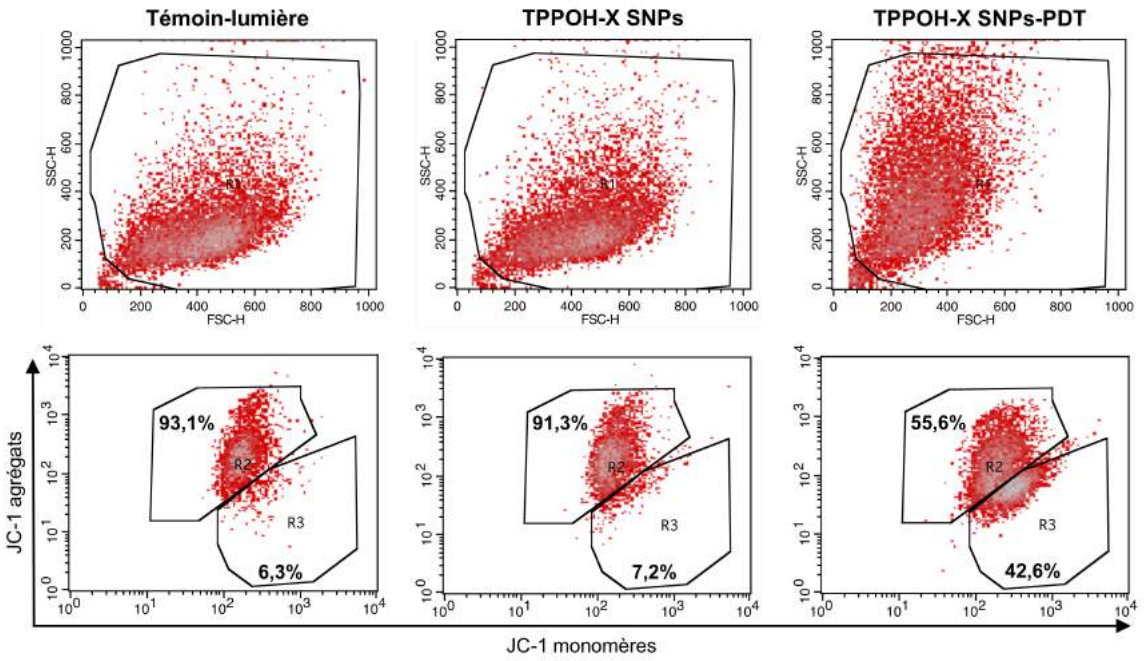


Figure 97 : étude du potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules HCT116

Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été marquées avec la sonde JC-1 et le ΔΨm a été estimé par analyse en cytométrie en flux. Le 1er graphique représente la population de cellules sélectionnées (R1). Le 2nd graphique représente les cellules concentrant la sonde JC-1 sous forme d'agrégats, c'est à dire ayant un ΔΨm intact (R2) et les cellules concentrant la sonde JC-1 sous forme de monomères, c'est à dire ayant un ΔΨm altéré (R3).

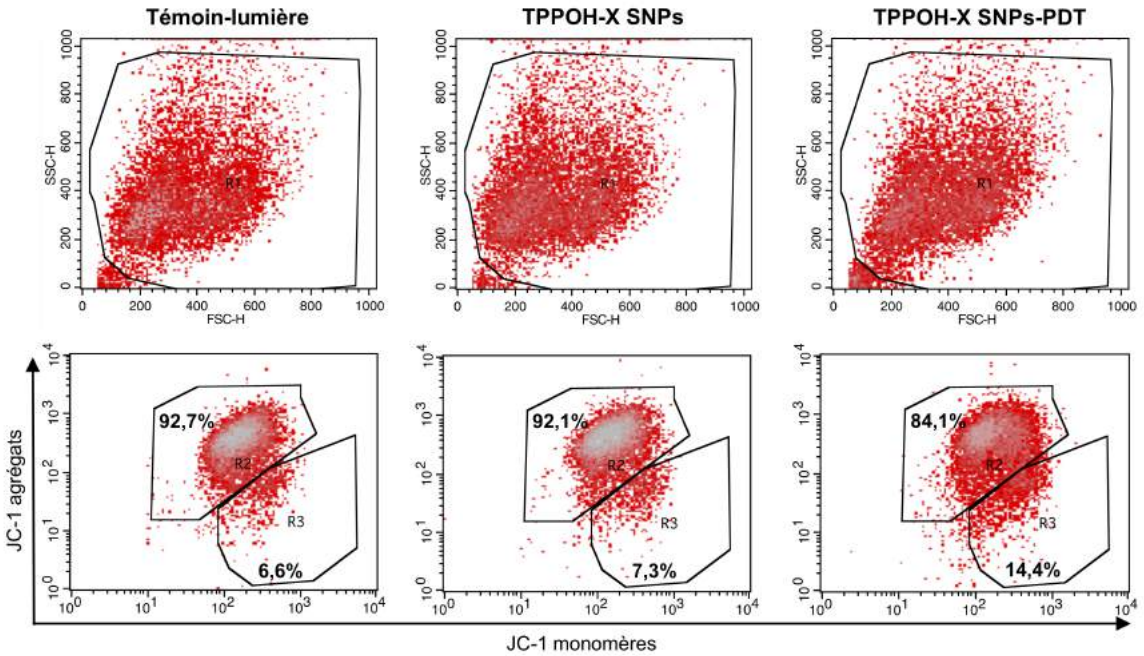


Figure 98 : étude du potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules HT-29

Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été marquées avec la sonde JC-1 et le ΔΨm a été estimé par analyse en cytométrie en flux. Le 1er graphique représente la population de cellules sélectionnées (R1). Le 2nd graphique représente les cellules concentrant la sonde JC-1 sous forme d'agrégats, c'est à dire ayant un ΔΨm intact (R2) et les cellules concentrant la sonde JC-1 sous forme de monomères, c'est à dire ayant un ΔΨm altéré (R3).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

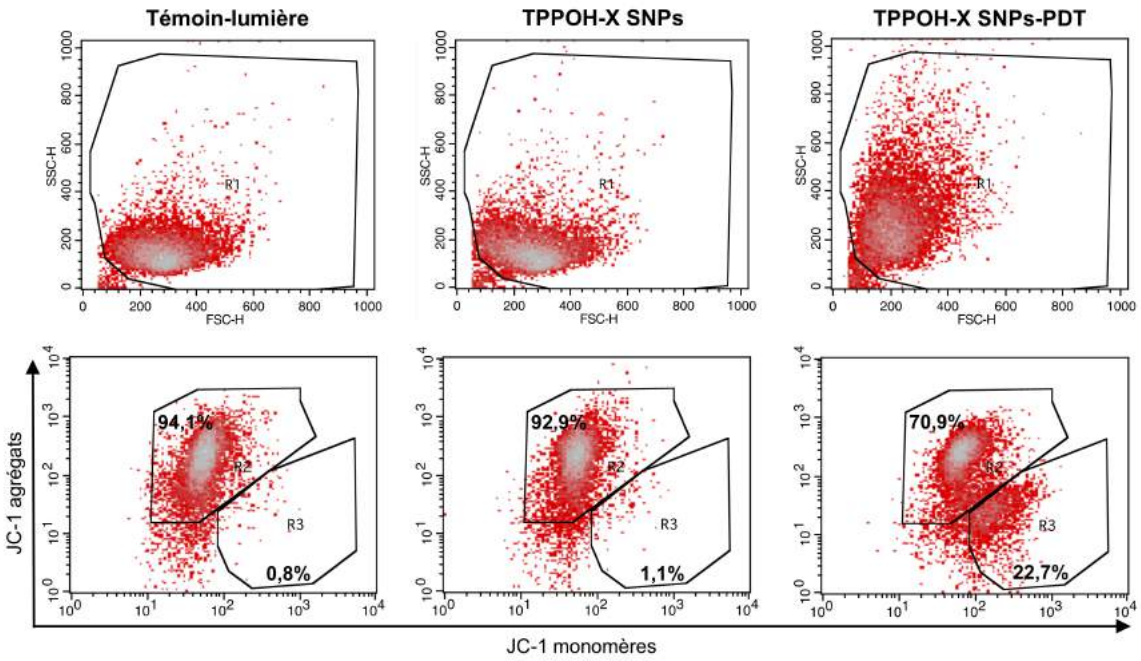


Figure 99 : étude du potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules SW620

Les cellules SW620 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été marquées avec la sonde JC-1 et le ΔΨm a été estimé par analyse en cytométrie en flux. Le 1er graphique représente la population de cellules sélectionnées (R1). Le 2nd graphique représente les cellules concentrant la sonde JC-1 sous forme d'agrégats, c'est à dire ayant un ΔΨm intact (R2) et les cellules concentrant la sonde JC-1 sous forme de monomères, c'est à dire ayant un ΔΨm altéré (R3).

Ces résultats montrent que la photoactivation des TPPOH-X SNPs entraîne une déstabilisation du ΔΨm dans les 3 lignées cellulaires considérées, synonyme de l'activation du processus apoptotique **(Figures 97-99)**. Le traitement des cellules HCT116 avec les TPPOH-X SNPs n'entraîne pas de déstabilisation du ΔΨm par rapport à la condition témoin-lumière du fait de la présence de 7,2% et de 6,3% de sonde JC-1 sous forme de monomères respectivement **(Figure 97)**. En revanche, après traitement et photoactivation des TPPOH-X SNPs, le ΔΨm est déstabilisé car il se produit une augmentation du % de sonde JC-1 sous forme de monomères à 42,6%. Des résultats similaires sont observés pour les cellules SW620 avec une augmentation du % de sonde JC-1 sous forme de monomères de 1,1% et 0,8% pour les conditions TPPOH-X SNPs et témoin-lumière respectivement, contre 22,7% après photoactivation des TPPOH-X SNPs **(Figure 99)**. Ces résultats sont également montrés pour les cellules HT-29 avec une augmentation de % de sonde JC-1 sous forme de monomères de 7,3% et 6,6% à 14,4% respectivement **(Figure 98)**. Cette plus faible augmentation renforce la plus grande résistance des cellules HT-29 dans cette étude.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.7. Étude du niveau d'apoptose

Afin de confirmer le processus de mort cellulaire induit par les TPPOH-X SNPs-PDT, le niveau d'apoptose dans les cellules a été analysé grâce à l'annexine V et l'iodure de propidium **(Figures 100-102)**. L'un des premiers évènements de l'entrée en apoptose d'une cellule est la translocation des phosphatidylsérines avec une exposition intracellulaire vers l'extérieur de la membrane plasmique. Comme l'annexine V est une protéine possédant une forte affinité pour les phosphatidylsérines, le niveau d'apoptose des cellules peut être facilement déterminé. L'IP est utilisé afin de discriminer les cellules en phase précoce et en phase tardive de l'apoptose. En effet, l'IP ne pénètre dans les cellules uniquement quand la membrane plasmique est altérée, c'est à dire lorsque les cellules sont en phase tardive de l'apoptose.

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans du milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Après 24 h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol puis les cellules ont été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont ensuite été marquées avec l'annexine V couplée au fluorochrome FITC et avec l'IP, puis le pourcentage de cellules en apoptose a ensuite été déterminé par une analyse en cytométrie en flux.

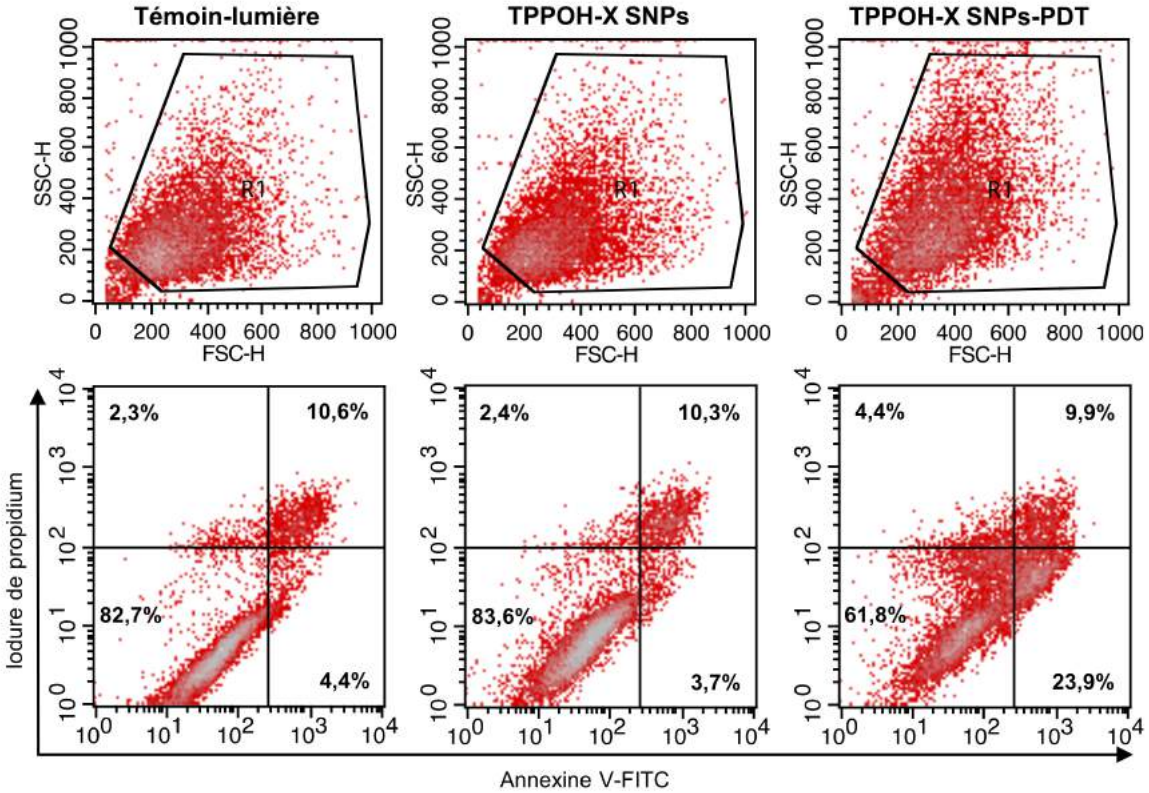


Figure 100 : étude du niveau d'apoptose dans les cellules HCT116

Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été marquées avec l'annexine V-FITC et l'IP puis le pourcentage de cellules en apoptose a ensuite été déterminé par une analyse en cytométrie en flux. Le 1er graphique représente la population de cellules sélectionnées (R1). Le 2nd graphique représente la viabilité des cellules. La population en bas à gauche représente les cellules vivantes (annexine V neg. / IP neg.), celle en bas à droite les cellules en apoptose précoce (annexine V pos. / IP neg.) et celle en haut à droite les cellules en apoptose tardive (annexine V pos. / IP pos). La population en haut à gauche concerne les débris nucléaires.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

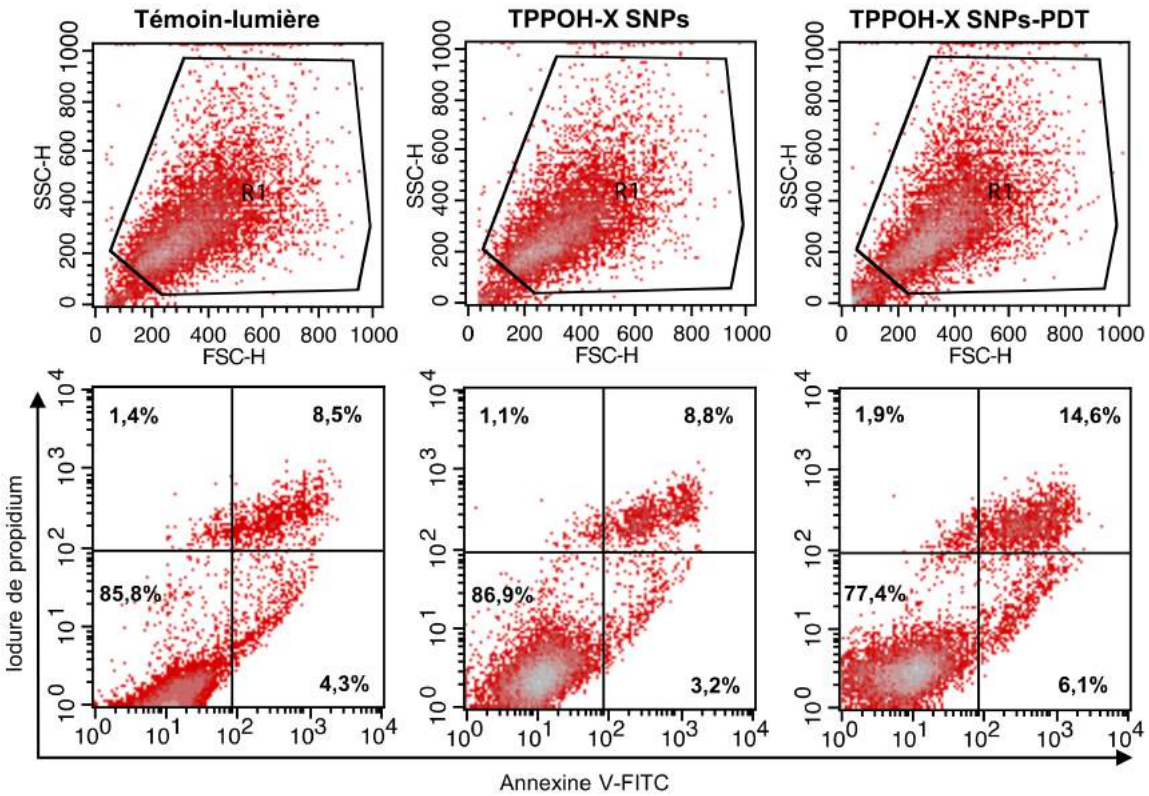


Figure 101 : étude du niveau d'apoptose dans les cellules HT-29

Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été marquées avec l'annexine V-FITC et l'IP puis le pourcentage de cellules en apoptose a ensuite été déterminé par une analyse en cytométrie en flux. Le 1er graphique représente la population de cellules sélectionnées (R1). Le 2nd graphique représente la viabilité des cellules. La population en bas à gauche représente les cellules vivantes (annexine V neg. / IP neg.), celle en bas à droite les cellules en apoptose précoce (annexine V pos. / IP neg.) et celle en haut à droite les cellules en apoptose tardive (annexine V pos. / IP pos). La population en haut à gauche concerne les débris nucléaires.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

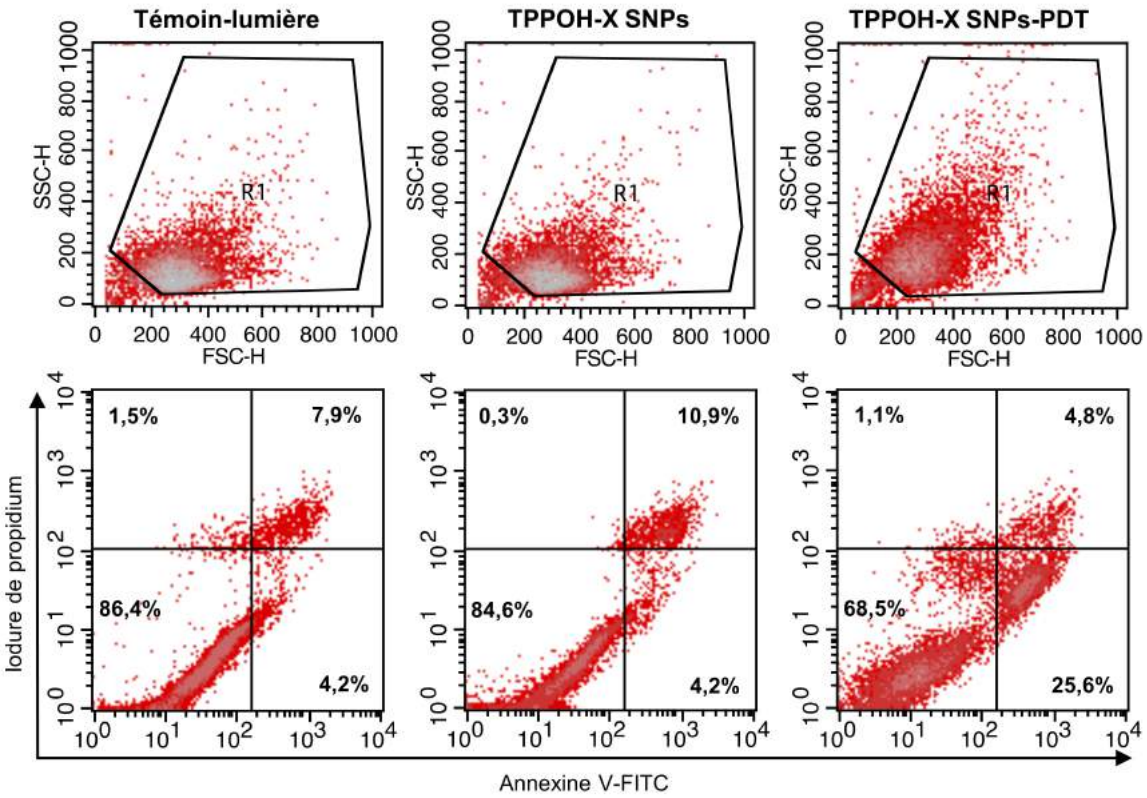


Figure 102 : étude du niveau d'apoptose dans les cellules SW620

Les cellules SW620 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été marquées avec l'annexine V-FITC et l'IP puis le pourcentage de cellules en apoptose a ensuite été déterminé par une analyse en cytométrie en flux. Le 1er graphique représente la population de cellules sélectionnées (R1). Le 2nd graphique représente la viabilité des cellules. La population en bas à gauche représente les cellules vivantes (annexine V neg. / IP neg.), celle en bas à droite les cellules en apoptose précoce (annexine V pos. / IP neg.) et celle en haut à droite les cellules en apoptose tardive (annexine V pos. / IP pos). La population en haut à gauche concerne les débris nucléaires.

Ces résultats montrent que la photoactivation des TPPOH-X SNPs entraîne une augmentation du nombre de cellules en apoptose dans les 3 lignées cellulaires considérées **(Figures 100-102)**. Le traitement des cellules HCT116 avec les TPPOH-X SNPs n'entraîne pas d'induction de l'apoptose par rapport à la condition témoin-lumière puisque 14% et 15% des cellules sont en apoptose précoce ou tardive dans ces conditions respectivement **(Figure 100)**. En revanche, après traitement et photoactivation des TPPOH-X SNPs, le niveau d'apoptose est augmenté passant à 33,8% de cellules en apoptose précoce ou tardive. Des résultats similaires sont observés pour les cellules SW620 avec une augmentation du niveau d'apoptose passant de 15,1% et 12,1% dans les conditions TPPOH-X SNPs et témoin-lumière respectivement, à 30,4% dans la condition TPPOH-X SNPs-PDT **(Figure 102)**. Les résultats pour les cellules HT-29 suivent la même tendance que pour les 2 autres lignées mais, comme pour la déstabilisation du $\Delta\Psi m$, de façon moins marquée en passant de 12% et 12,8% à 20,7% de cellules en apoptose respectivement **(Figure 101)**.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.8. Analyse quantitative des caspases 3/7 activées

Le processus apoptotique étant mis en place, l'étude des évènements plus tardifs de l'apoptose a ainsi été réalisée. L'analyse quantitative des caspases 3/7 activées, caspases effectrices conduisant au clivage de nombreux substrats cellulaires essentiels à la survie des cellules, a été étudiée grâce au système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte® S3 pendant 48 h **(Figures 103-105)**.

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans du milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Après 24 h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol puis les cellules ont été irradiées ou non. Les cellules ont ensuite été traitées avec le réactif vert caspase 3/7 et placées dans le système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte® S3. Toutes les 2 h pendant 48 h, des images des cellules ont été prises et la quantité de cellules exprimant une fluorescence verte a été quantifiée au cours du temps.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

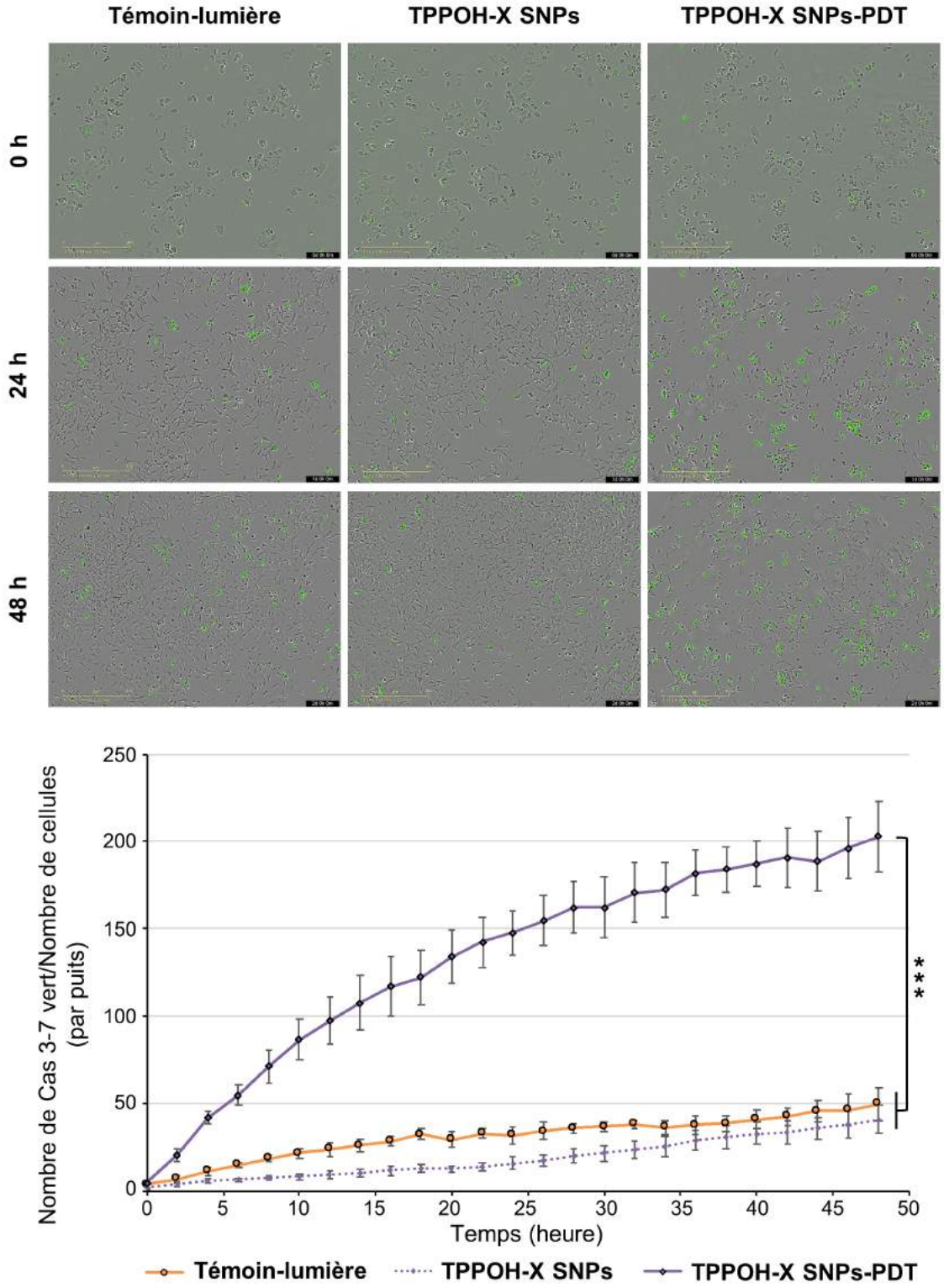


Figure 103 : analyse quantitative des caspases 3/7 activées dans les cellules HCT116

Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non puis traitées avec le réactif vert caspase 3/7 et placées dans le système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte® S3. Toutes les 2 h, des images des cellules ont été prises à hauteur de 4 images par puits en contraste de phase et en fluorescence verte en utilisant l'objectif x10. Des images représentatives sont montrées pour chaque condition de traitement aux temps 0, 24 et 48 h. La barre d'échelle jaune représente 400 µm. La quantité de cellules en apoptose a été quantifiée avec le logiciel IncuCyte® en utilisant le rapport du nombre de cellules fluorescentes en vert normalisé par le nombre de cellules totales dans chaque puits au cours du temps sur 48 h. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 3$ et ***$p < 0{,}001$.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

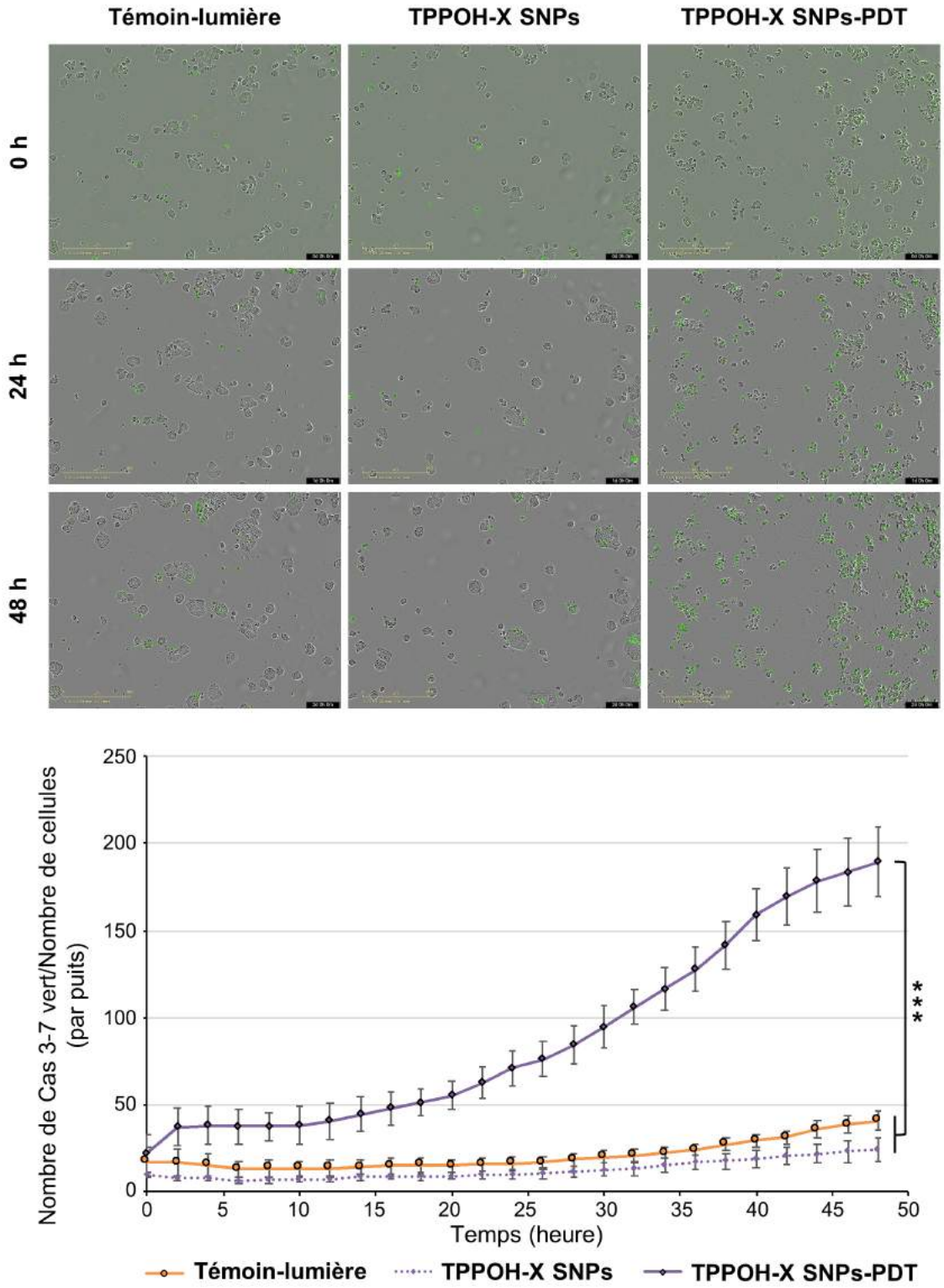


Figure 104 : analyse quantitative des caspases 3/7 activées dans les cellules HT-29

Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non puis traitées avec le réactif vert caspase 3/7 et placées dans le système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte® S3. Toutes les 2 h, des images des cellules ont été prises à hauteur de 4 images par puits en contraste de phase et en fluorescence verte en utilisant l'objectif x10. Des images représentatives sont montrées pour chaque condition de traitement aux temps 0, 24 et 48 h. La barre d'échelle jaune représente 400 µm. La quantité de cellules en apoptose a été quantifiée avec le logiciel IncuCyte® en utilisant le rapport du nombre de cellules fluorescentes en vert normalisé par le nombre de cellules totales dans chaque puits au cours du temps sur 48 h. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 3$ et ***$p < 0{,}001$.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

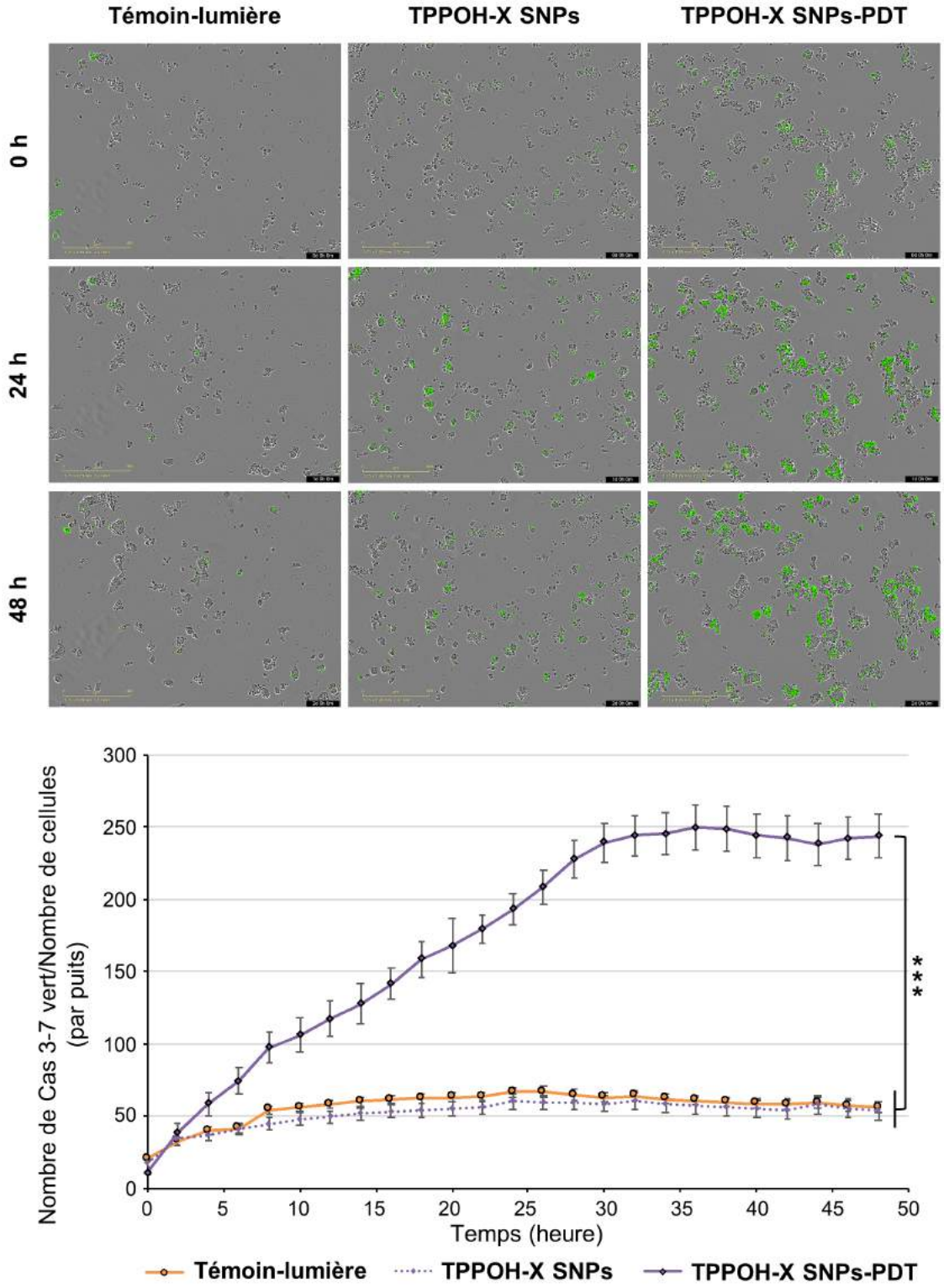


Figure 105 : analyse quantitative des caspases 3/7 activées dans les cellules SW620

Les cellules SW620 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non puis traitées avec le réactif vert caspase 3/7 et placées dans le système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte® S3. Toutes les 2 h, des images des cellules ont été prises à hauteur de 4 images par puits en contraste de phase et en fluorescence verte en utilisant l'objectif x10. Des images représentatives sont montrées pour chaque condition de traitement aux temps 0, 24 et 48 h. La barre d'échelle jaune représente 400 µm. La quantité de cellules en apoptose a été quantifiée avec le logiciel IncuCyte® en utilisant le rapport du nombre de cellules fluorescentes en vert normalisé par le nombre de cellules totales dans chaque puits au cours du temps sur 48 h. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 3$ et ***$p < 0{,}001$.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Ces résultats montrent que la photoactivation des TPPOH-X SNPs entraîne une augmentation de la quantité de caspases 3/7 activées dans les 3 lignées cellulaires considérées **(Figures 103-105)**. En effet, le traitement des cellules HCT116 avec les TPPOH-X SNPs entraîne une augmentation significative au cours du temps de plus de 4 fois supérieure par rapport à la condition témoin-lumière à 48 h **(Figure 103)**. En revanche, lorsque les cellules HCT116 sont traitées avec les TPPOH-X SNPs mais non photoactivées, il n'y a pas d'augmentation de la quantité de caspases 3/7 activées par rapport à la condition témoin-lumière. Des résultats similaires sont observés pour les cellules HT-29 **(Figure 104)** et SW620 **(Figure 105)** avec une augmentation de plus de 4 fois supérieure également uniquement lorsque les TPPOH-X SNPs sont photoactivées.

I.9. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN

Comme la quantité des caspases effectrices 3/7 activées augmente, l'activation d'endonucléases clivant l'ADN en fragments oligo-nucléosomiques d'environ 180-200 paires de bases devrait se produire. L'analyse de la quantité d'ADN fragmenté a donc été étudiée afin de quantifier cette étape tardive de l'apoptose **(Figures 106-108)**.

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans du milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Après 24 h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol puis les cellules ont été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont ensuite été récupérées et la fragmentation de l'ADN a été quantifiée par un test ELISA.

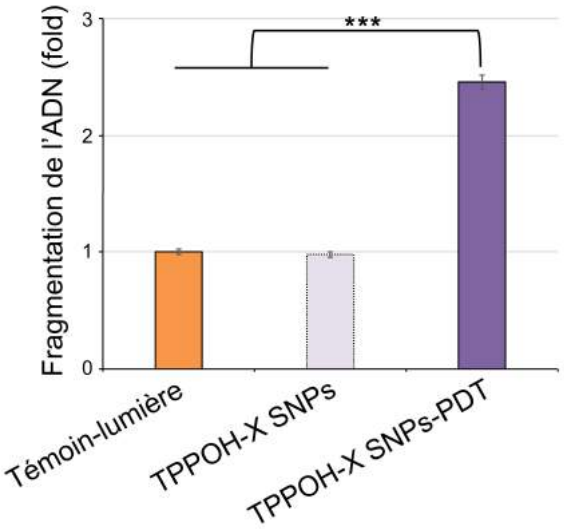


Figure 106 : analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN dans les cellules HCT116

Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été récupérées et la fragmentation de l'ADN a été quantifiée par un test ELISA. La quantité d'ADN fragmenté dans la condition témoin-lumière est normalisée à 1 et celle des conditions traitées est exprimée en n-fold comparé à la condition témoin-lumière. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 3$ et ***$p < 0,001$.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

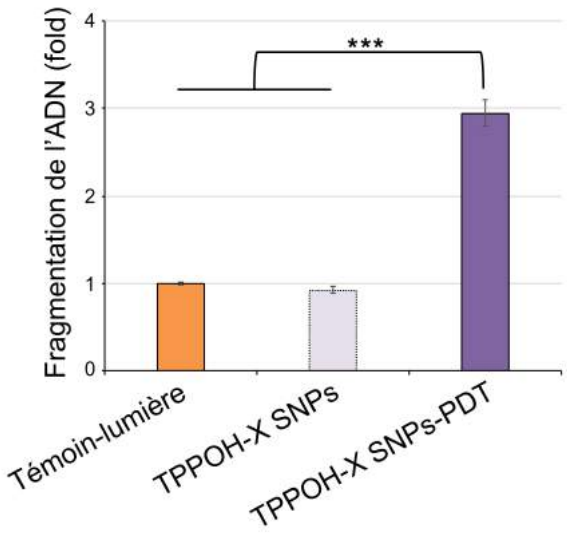


Figure 107 : analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN dans les cellules HT-29

Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été récupérées et la fragmentation de l'ADN a été quantifiée par un test ELISA. La quantité d'ADN fragmenté dans la condition témoin-lumière est normalisée à 1 et celle des conditions traitées est exprimée en n-fold comparé à la condition témoin-lumière. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 3$ et ***$p < 0,001$.

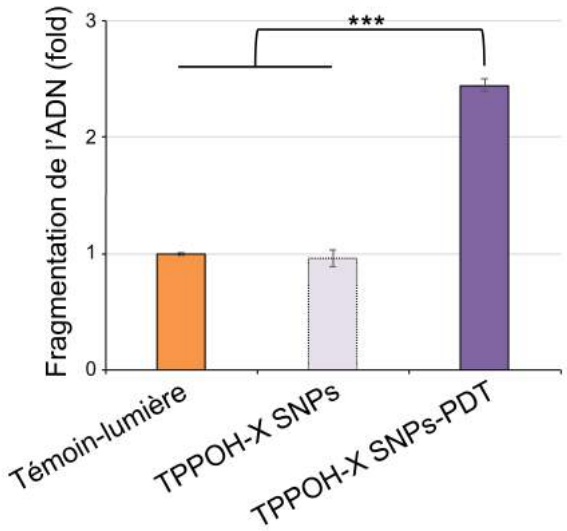


Figure 108 : analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN dans les cellules SW620

Les cellules SW620 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été récupérées et la fragmentation de l'ADN a été quantifiée par un test ELISA. La quantité d'ADN fragmenté dans la condition témoin-lumière est normalisée à 1 et celle des conditions traitées est exprimée en n-fold comparé à la condition témoin-lumière. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 3$ et ***$p < 0,001$.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Ces résultats montrent que la photoactivation des TPPOH-X SNPs entraîne une augmentation de la fragmentation de l'ADN dans les 3 lignées cellulaires considérées par rapport à la condition témoin-lumière après 48 h **(Figures 106-108)**. En effet, le traitement des cellules HCT116 avec les TPPOH-X SNPs-PDT entraîne une augmentation significative de 2,5 fois par rapport à la condition témoin-lumière **(Figure 106)**. En revanche, lorsque les cellules HCT116 sont traitées avec les TPPOH-X SNPs mais non photoactivées, il n'y a pas d'augmentation de la quantité d'ADN fragmenté. Des résultats similaires sont observés pour les cellules HT-29 **(Figure 107)** et les cellules SW620 **(Figure 108)** avec une augmentation de 2,9 et 2,4 fois respectivement, comparé à la condition témoin-lumière uniquement lorsque les TPPOH-X SNPs sont photoactivées.

I.10. Analyse de la morphologie cellulaire par MET

Afin de confirmer la mise en place du processus apoptotique dans les cellules après traitement avec les TPPOH-X SNPs-PDT, la morphologie des cellules selon les conditions de traitements a été analysée par MET **(Figures 109-111)**.

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans du milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées ou avec les SNPs aux mêmes concentrations en SNPs que les TPPOH-X SNPs. Après 24 h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol puis les cellules ont été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont ensuite été récupérées, préparées et analysées par MET.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

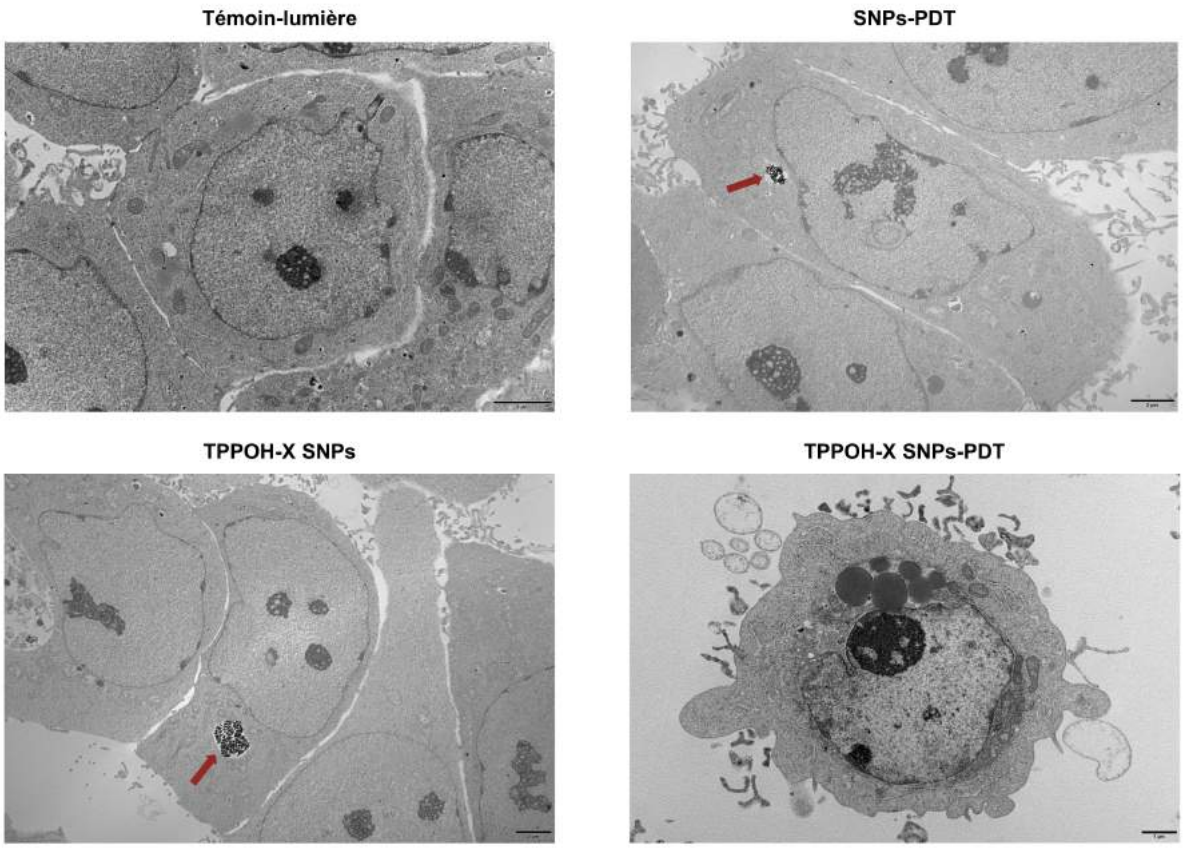


Figure 109 : analyse de la morphologie cellulaire des cellules HCT116 par MET

Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée ou avec les SNPs à la même concentration en SNPs que les TPPOH-X SNPs pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été récupérées, préparées et analysées par MET et des images représentatives sont visualisées. La flèche rouge indique la présence intracellulaire de SNPs. La barre d'échelle noire représente 2 µm excepté pour la condition TPPOH-X SNPs-PDT où elle représente 1 µm.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

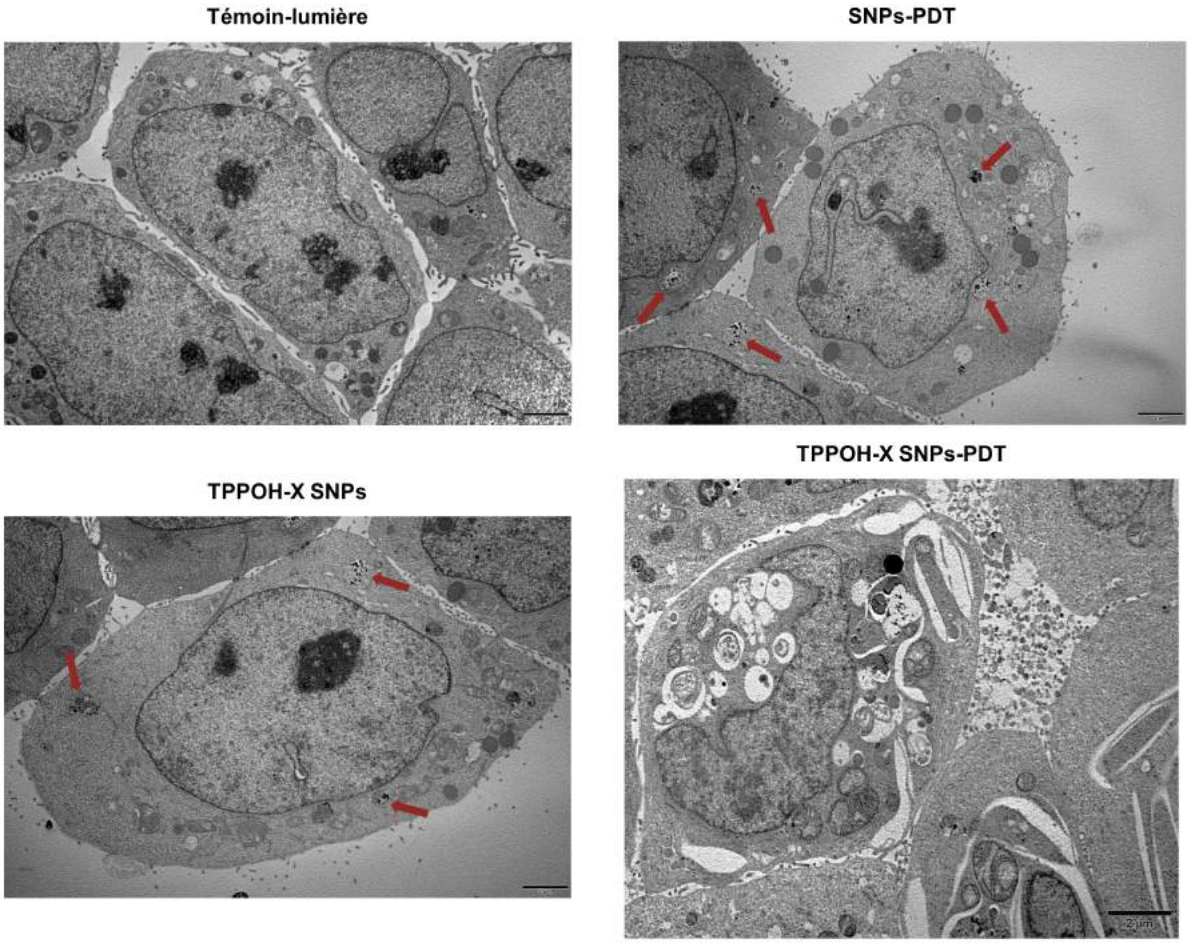


Figure 110 : analyse de la morphologie cellulaire des cellules HT-29 par MET

Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée ou avec les SNPs à la même concentration en SNPs que les TPPOH-X SNPs pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été récupérées, préparées et analysées par MET et des images représentatives sont visualisées. Les flèches rouges indiquent la présence intracellulaire de SNPs. La barre d'échelle noire représente 2 µm.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

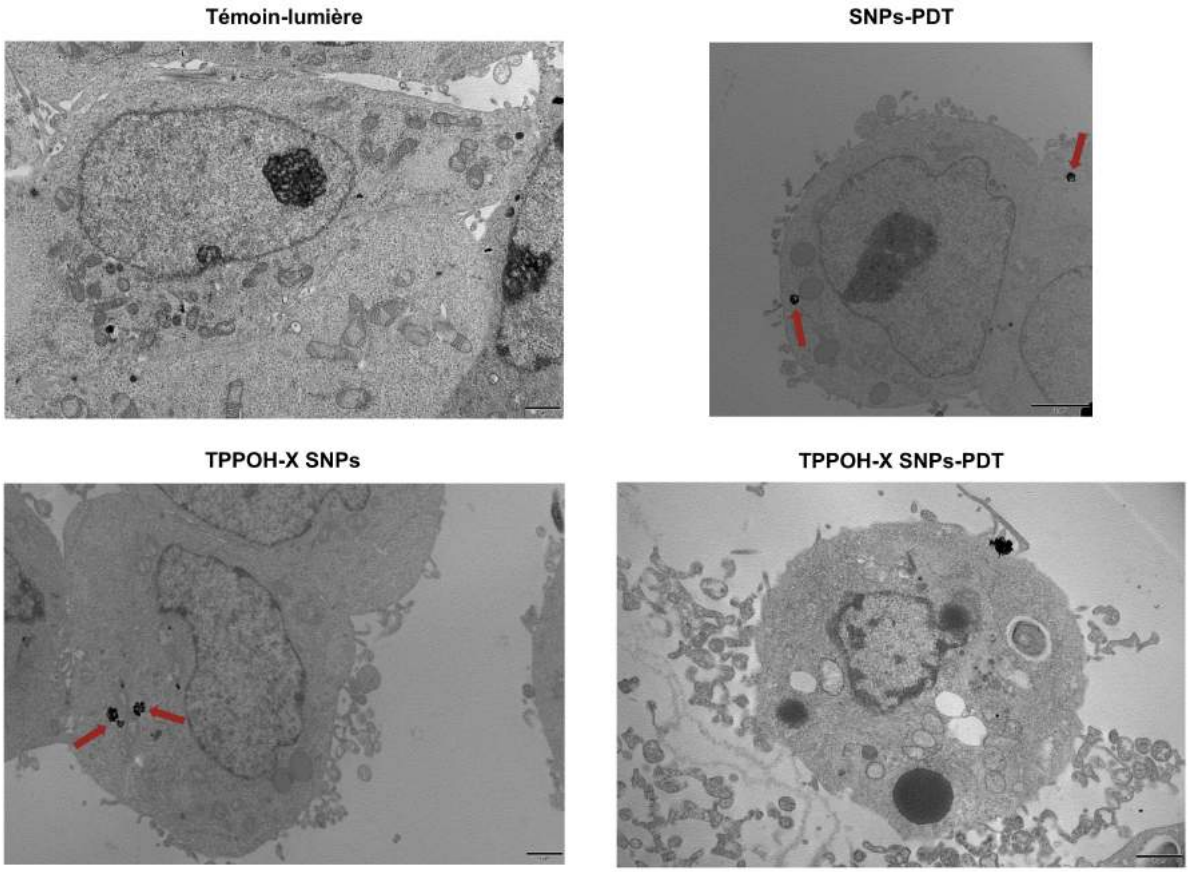


Figure 111 : analyse de la morphologie cellulaire des cellules SW620 par MET

Les cellules SW620 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée ou avec les SNPs à la même concentration en SNPs que les TPPOH-X SNPs pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été récupérées, préparées et analysées par MET et des images représentatives sont visualisées. Les flèches rouges indiquent la présence intracellulaire de SNPs. La barre d'échelle noire représente 1 µm excepté pour la condition SNPs-PDT où elle représente 2 µm.

L'analyse morphologique des cellules HCT116 **(Figure 109)**, HT-29 **(Figure 110)** et SW620 **(Figure 111)** ne montre pas de différence morphologique entre les cellules traitées avec les TPPOH-X SNPs, avec les SNPs-PDT et les cellules de la condition témoin-lumière. Les cellules présentent une morphologie normale avec des structures cellulaires et des noyaux intacts. En revanche, lorsque les cellules sont traitées avec les TPPOH-X SNPs-PDT, alors elles présentent une déstabilisation des structures intracellulaires. En effet, la membrane cellulaire se rétracte, le noyau se condense, des vésicules de phagocytose et des corps apoptotiques se forment. Cette désorganisation des structures intracellulaires dans les cellules traitées avec les TPPOH-X SNPs photoactivées est le signe caractéristique de cellules en apoptose.

I.11. Quantification de l'expression d'acteurs de l'autophagie

Il est démontré que lors des traitements par PDT, l'autophagie joue souvent un rôle de résistance à l'apoptose. L'expression d'acteurs de l'autophagie à différentes étapes a donc été analysée.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Les expressions de bécline-1, acteur dans l'initiation, et celle d'Atg5 jouant un rôle dans l'élongation de l'autophagie ont ainsi été déterminées **(Figures 112-114)**. De plus, puisque le complexe LC3-II est essentiel à la maturation de l'autophagosome et qu'il n'est dégradé qu'après fusion avec les lysosomes, l'expression de ce marqueur de choix dans l'étude de l'autophagie a également été analysée.

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans du milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Après 24 h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol, les cellules ont été traitées ou non avec un inhibiteur pharmacologique de l'initiation de l'autophagie, la 3-MA, puis les cellules ont été irradiées. Après 48 h, les cellules ont ensuite été récupérées et l'expression des protéines a été déterminée par Western blot (WB).

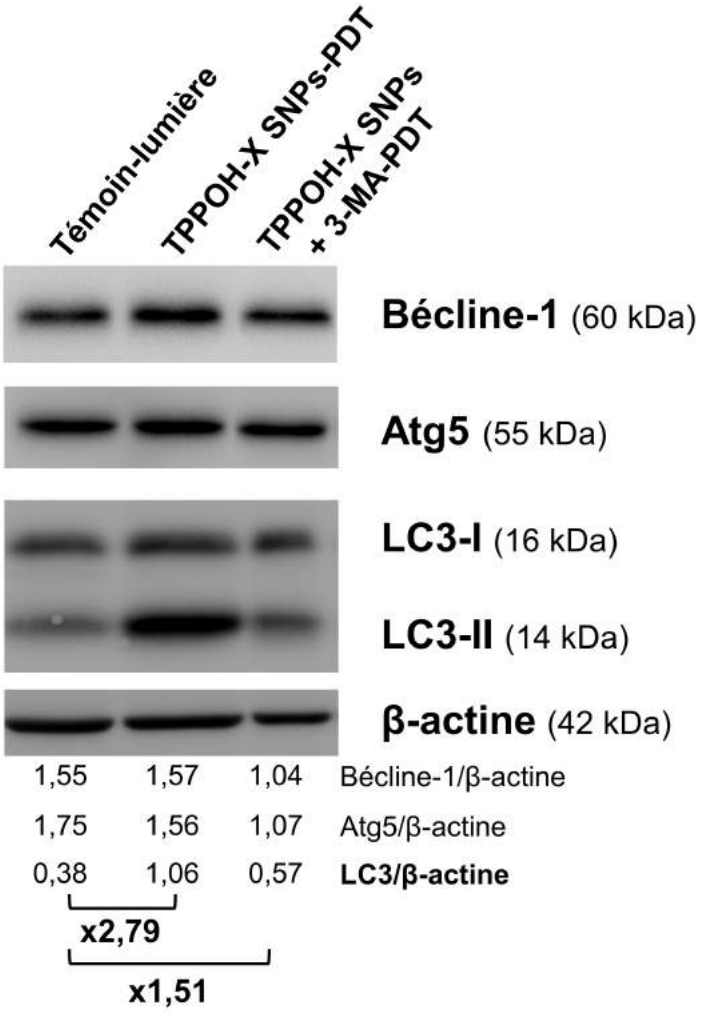


Figure 112 : quantification de l'expression d'acteurs de l'autophagie dans les cellules HCT116

Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la 3-MA puis elles ont été irradiées. Après 48 h, les cellules ont été récupérées et l'expression des protéines a été déterminée par WB. Des images représentatives sont montrées. L'intensité relative des bandes a été déterminée grâce au logiciel de traitement d'images ImageJ et la β-actine a été utilisée comme protéine de référence.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

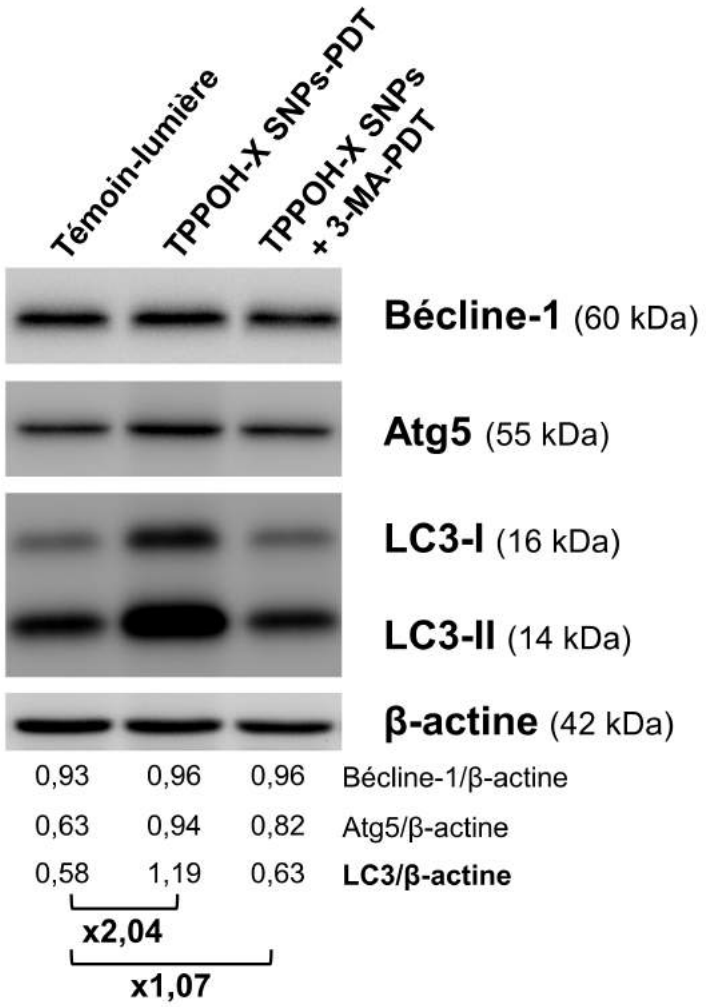


Figure 113 : quantification de l'expression d'acteurs de l'autophagie dans les cellules HT-29

Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la 3-MA puis elles ont été irradiées. Après 48 h, les cellules ont été récupérées et l'expression des protéines a été déterminée par WB. Des images représentatives sont montrées. L'intensité relative des bandes a été déterminée grâce au logiciel de traitement d'images ImageJ et la β-actine a été utilisée comme protéine de référence.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

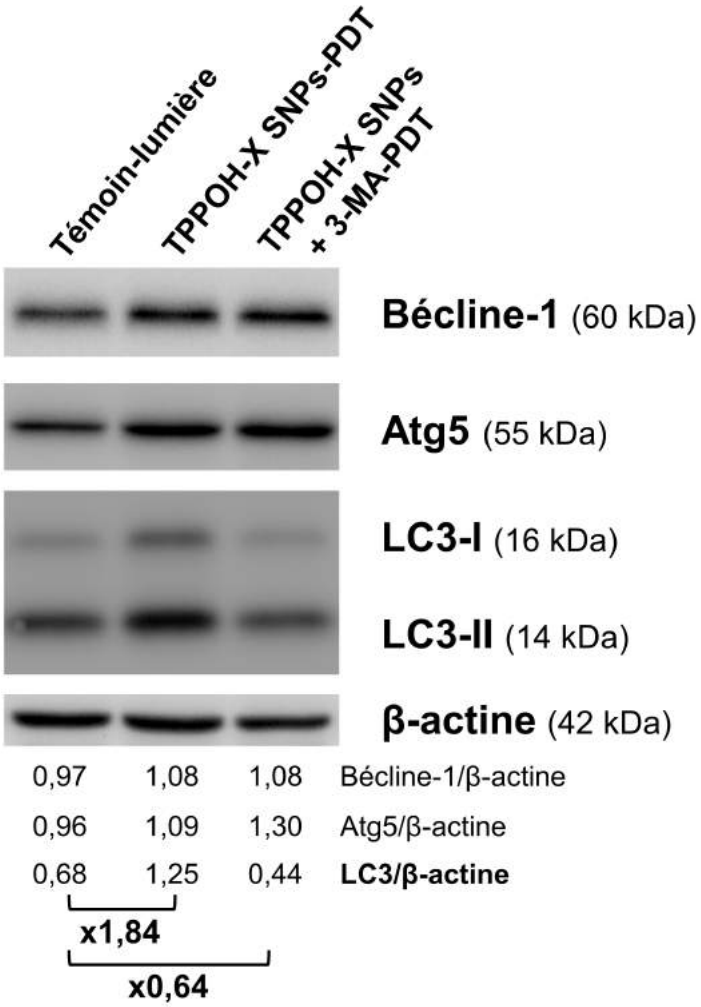


Figure 114 : quantification de l'expression d'acteurs de l'autophagie dans les cellules SW620

Les cellules SW620 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la 3-MA puis elles ont été irradiées. Après 48 h, les cellules ont été récupérées et l'expression des protéines a été déterminée par WB. Des images représentatives sont montrées. L'intensité relative des bandes a été déterminée grâce au logiciel de traitement d'images ImageJ et la β-actine a été utilisée comme protéine de référence.

Ces résultats montrent que, quelle que soit la lignée cellulaire concernée, le traitement des cellules par les TPPOH-X SNPs photoactivées entraîne une augmentation de l'autophagie **(Figures 112-114)**. La photoactivation des TPPOH-X SNPs dans les cellules HCT116 n'entraîne pas d'augmentation significative des acteurs des phases précoces de l'autophagie bécline-1 et Atg5 par rapport à la condition témoin-lumière. En revanche, la quantité de protéine LC3 ainsi que sa conversion de sa forme I en sa forme II est fortement augmentée, d'une valeur 2,79 fois supérieure à la condition témoin-lumière, mettant en évidence une forte augmentation de l'autophagie après traitement par les TPPOH-X SNPs photoactivées **(Figure 112)**. Des résultats similaires sont observés dans les cellules HT-29 **(Figure 113)** et les cellules SW620 **(Figure 114)** pour lesquelles le traitement par les TPPOH-X SNPs-PDT induit une augmentation de 2,04 et 1,84 fois respectivement de la quantité de protéine LC3 ainsi que de la conversion de sa forme I en sa forme II par rapport à la condition témoin-lumière.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Le traitement des cellules avec un inhibiteur pharmacologique de l'initiation de l'autophagie, la 3-MA, permet de diminuer le niveau d'autophagie. En effet, lorsque les cellules HCT116 sont traitées avec les TPPOH-X SNPs-PDT et la 3-MA, la quantité de protéine LC3 ainsi que la conversion de sa forme I en sa forme II est diminuée car elle passe d'une valeur de 2,79 fois supérieure à la condition témoin-lumière à une valeur de 1,51 fois supérieure. La même tendance est retrouvée dans les cellules HT-29 et les cellules SW620 où les valeurs passent respectivement de 2,04 à 1,07 et de 1,84 à 0,64 fois supérieures à la condition témoin-lumière. Le traitement avec la 3-MA permet donc bien de diminuer l'autophagie dans les lignées cellulaires considérées.

I.11. Analyse de l'autophagie par MET

Afin de confirmer l'augmentation de l'autophagie lorsque les cellules sont traitées avec les TPPOH-X SNPs-PDT, des analyses en MET ont été réalisées **(Figures 115-117)**.

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans du milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Après 24 h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol puis les cellules ont été irradiées. Après 48 h, les cellules ont ensuite été récupérées, préparées et analysées par MET.

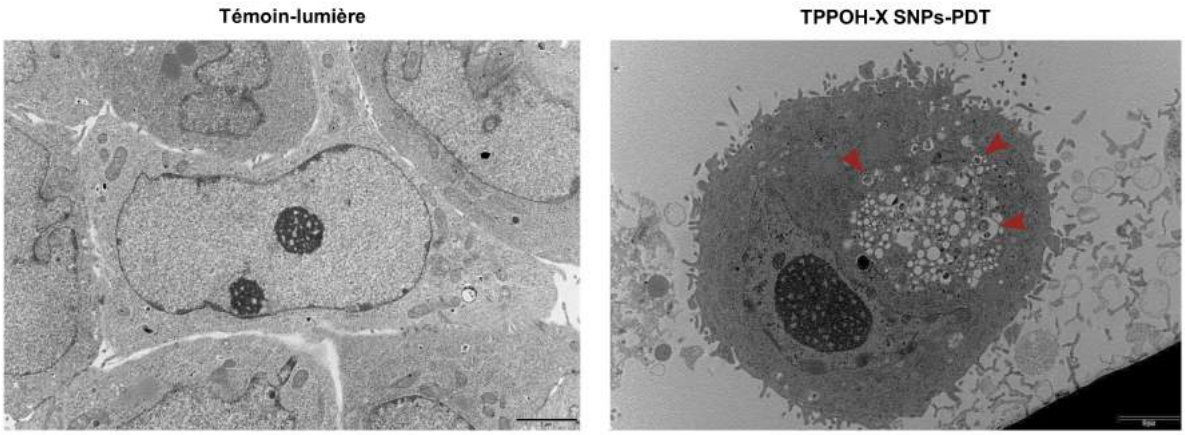


Figure 115 : analyse de l'autophagie dans les cellules HCT116 par MET

Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été récupérées, préparées et analysées par MET et des images représentatives sont visualisées. Les têtes de flèches rouges indiquent la présence de vésicules contenant des organelles cellulaires. La barre d'échelle noire représente 2 µm.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

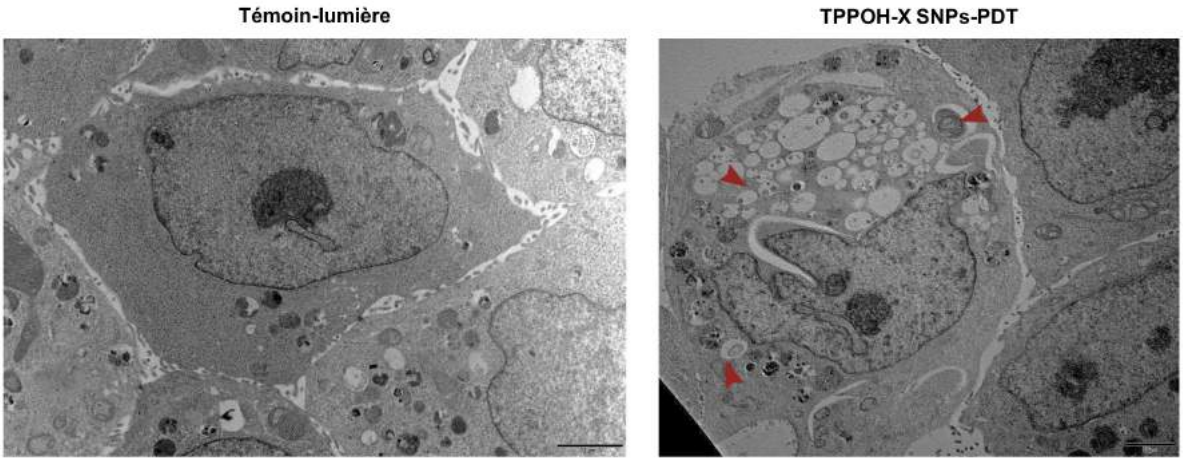


Figure 116 : analyse de l'autophagie dans les cellules HT-29 par MET

Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été récupérées, préparées et analysées par MET et des images représentatives sont visualisées. Les têtes de flèches rouges indiquent la présence de vésicules contenant des organelles cellulaires. La barre d'échelle noire représente 2 µm.

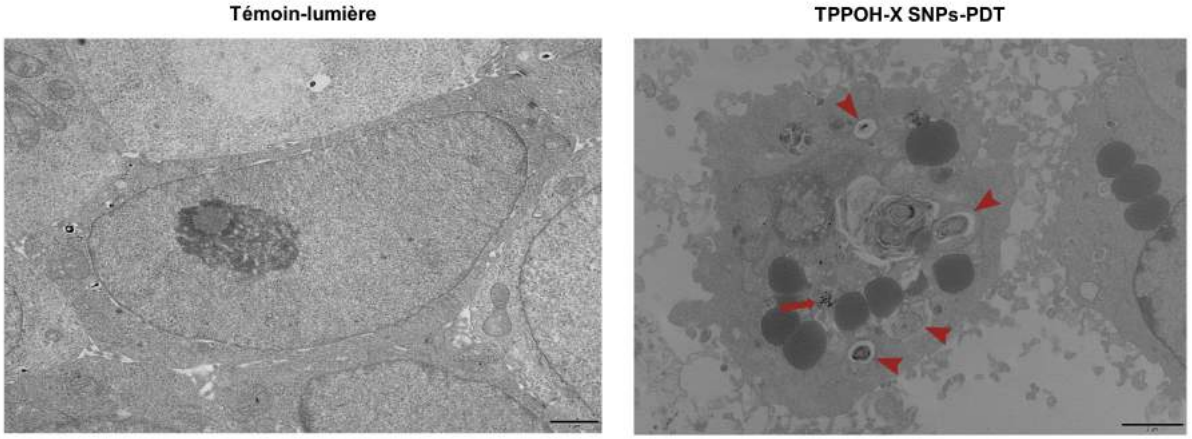


Figure 117 : analyse de l'autophagie dans les cellules SW620 par MET

Les cellules SW620 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été récupérées, préparées et analysées par MET et des images représentatives sont données. La flèche rouge indique la présence intracellulaire de SNPs et les têtes de flèches rouges indiquent la présence de vésicules contenant des organelles cellulaires. La barre d'échelle noire représente 1 µm pour la condition témoin-lumière et 2 µm pour la condition TPPOH-X SNPs-PDT.

L'analyse morphologique des cellules HCT116 **(Figure 115)**, HT-29 **(Figure 116)** et SW620 **(Figure 117)** traitées avec les TPPOH-X SNPs-PDT révèle des signes caractéristiques de cellules en autophagie. Outre les caractéristiques de cellules en apoptose décrit précédemment, les cellules présentent également une vacuolisation importante de leur cytoplasme, vésicules qui contiennent notamment des organelles ou des fragments cellulaires, ainsi que la présence d'autophagosomes à double membrane. La présence de vésicules contenant des organelles ou la présence d'autophagosomes sont caractéristiques de cellules en autophagie.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.12. Étude du niveau d'apoptose après inhibition de l'autophagie

Afin de déterminer si l'autophagie joue un rôle de résistance à l'apoptose dans cette étude, le niveau d'apoptose a été analysé grâce à l'annexine V et l'iodure de propidium après traitement ou non des cellules avec la 3-MA **(Figures 118-120)**.

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans du milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Après 24 h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol, les cellules ont été traitées ou non avec la 3-MA, puis les cellules ont été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont ensuite été marquées avec l'annexine V couplée au fluorochrome FITC et avec l'IP puis le pourcentage de cellules en apoptose a ensuite été déterminé par une analyse en cytométrie en flux.

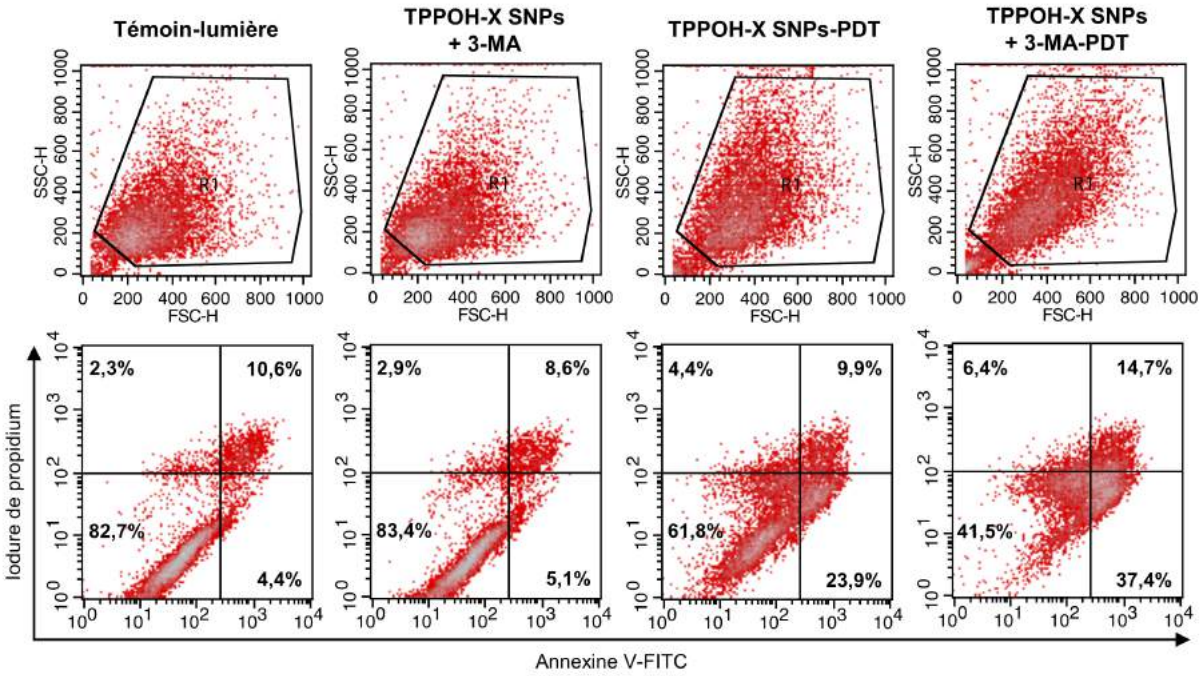


Figure 118 : étude du niveau d'apoptose après inhibition de l'autophagie dans les cellules HCT116

Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la 3-MA puis elles ont été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été marquées avec l'annexine V-FITC et l'IP puis le pourcentage de cellules en apoptose a ensuite été déterminé par une analyse en cytométrie en flux. Le 1er graphique représente la population de cellules sélectionnées (R1). Le 2nd graphique représente la viabilité des cellules. La population en bas à gauche représente les cellules vivantes (annexine V neg. / IP neg.), celle en bas à droite les cellules en apoptose précoce (annexine V pos. / IP neg.) et celle en haut à droite les cellules en apoptose tardive (annexine V pos. / IP pos). La population en haut à gauche concerne les débris nucléaires.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

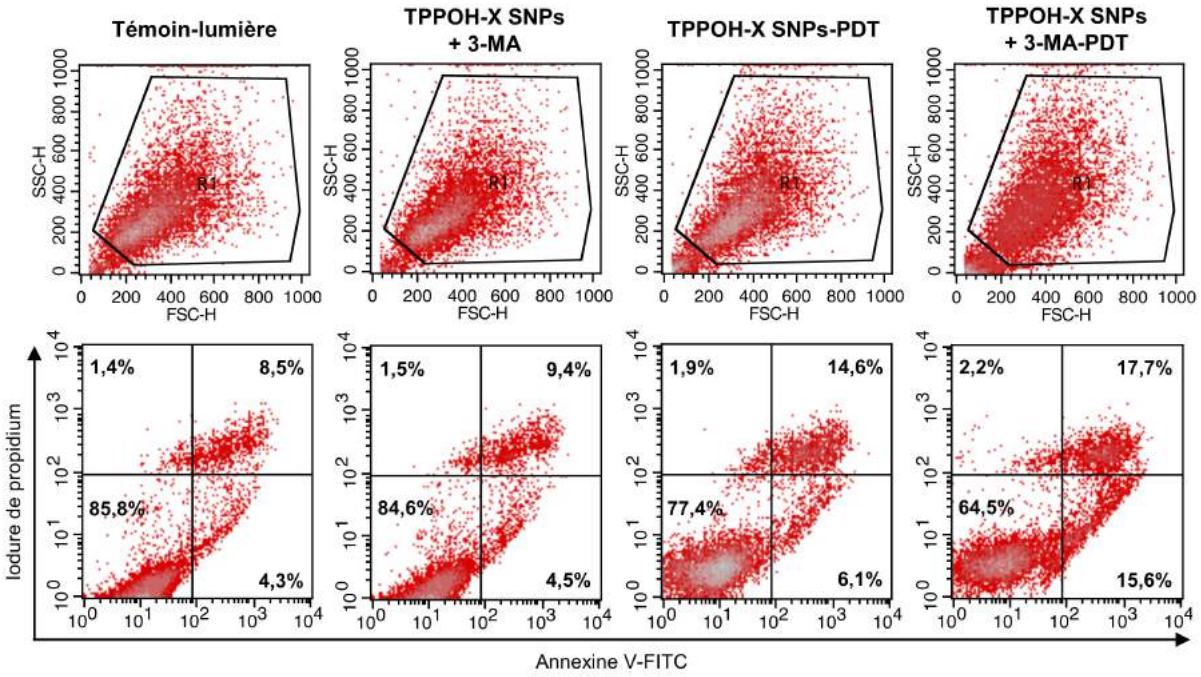


Figure 119 : étude du niveau d'apoptose après inhibition de l'autophagie dans les cellules HT-29

Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la 3-MA puis elles ont été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été marquées avec l'annexine V-FITC et l'IP puis le pourcentage de cellules en apoptose a ensuite été déterminé par une analyse en cytométrie en flux. Le 1er graphique représente la population de cellules sélectionnées (R1). Le 2nd graphique représente la viabilité des cellules. La population en bas à gauche représente les cellules vivantes (annexine V neg. / IP neg.), celle en bas à droite les cellules en apoptose précoce (annexine V pos. / IP neg.) et celle en haut à droite les cellules en apoptose tardive (annexine V pos. / IP pos). La population en haut à gauche concerne les débris nucléaires.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

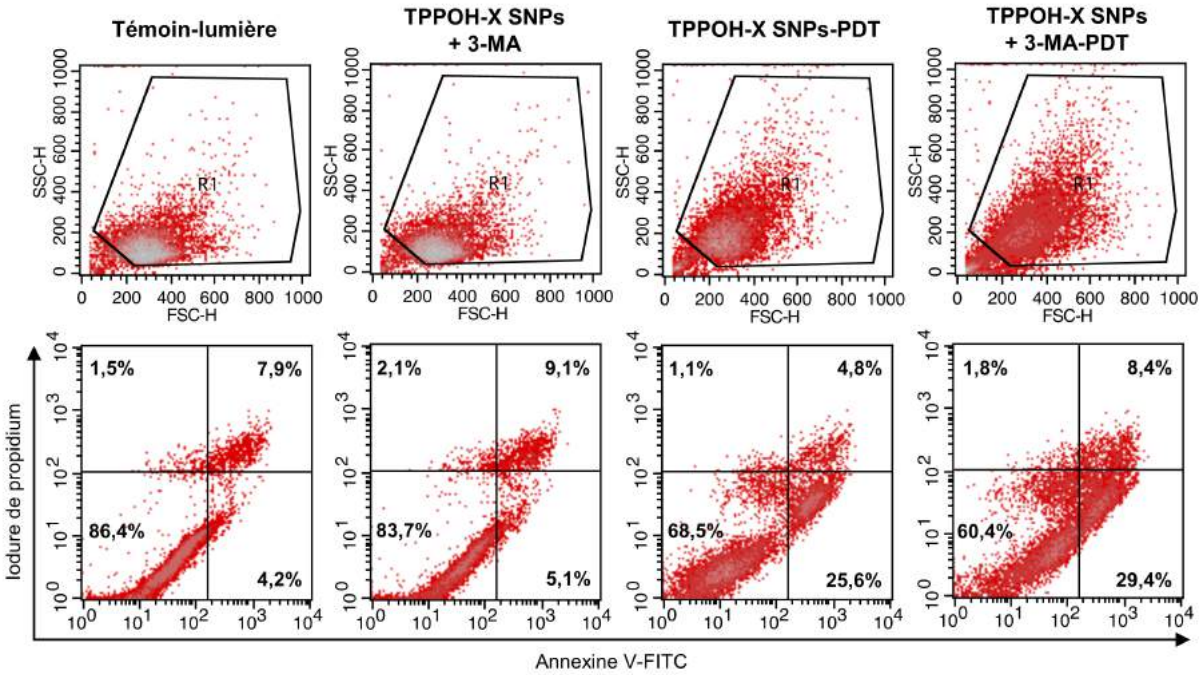


Figure 120 : étude du niveau d'apoptose après inhibition de l'autophagie dans les cellules SW620

Les cellules SW620 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la 3-MA puis elles ont été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été marquées avec l'annexine V-FITC et l'IP puis le pourcentage de cellules en apoptose a ensuite été déterminé par une analyse en cytométrie en flux. Le 1er graphique représente la population de cellules sélectionnées (R1). Le 2nd graphique représente la viabilité des cellules. La population en bas à gauche représente les cellules vivantes (annexine V neg. / IP neg.), celle en bas à droite les cellules en apoptose précoce (annexine V pos. / IP neg.) et celle en haut à droite les cellules en apoptose tardive (annexine V pos. / IP pos). La population en haut à gauche concerne les débris nucléaires.

Ces résultats montrent que l'inhibition de l'autophagie grâce à la 3-MA permet de décupler l'augmentation du nombre de cellules en apoptose induite par les TPPOH-X SNPs-PDT dans les 3 lignées cellulaires **(Figures 118-120)**. En effet, après traitement et photoactivation des TPPOH-X SNPs avec la 3-MA, le niveau d'apoptose est augmenté passant à 52,1% de cellules en apoptose précoce ou tardive alors, qu'en l'absence de 3-MA, seulement 33,8% des cellules sont en apoptose **(Figure 118)**. En revanche, l'augmentation du nombre de cellules en apoptose est uniquement due au rôle de résistance de l'autophagie à l'apoptose et non de la 3-MA elle-même puisque, lors du traitement des cellules HCT116 avec les TPPOH-X SNPs + 3-MA non photoactivées, aucune augmentation du nombre de cellules en apoptose n'est observée par rapport à la condition témoin-lumière avec des valeurs de 13,7% et 15% de cellules en apoptose respectivement. Des résultats similaires sont observés pour les cellules HT-29 **(Figure 119)** et les cellules SW620 **(Figure 120)** avec une augmentation du niveau d'apoptose passant respectivement de 20,7% et 30,4% après traitement avec les TPPOH-X SNPs-PDT à 33,3% et 37,8% pour la même condition co-traitée avec la 3-MA. Comme pour les cellules HCT116, le co-traitement avec la 3-MA et les TPPOH-X SNPs n'entraîne pas d'induction de l'apoptose par rapport à la condition témoin-lumière avec des valeurs respectivement de 13,9% contre 12,8% et 14,2% contre 12,1% pour les cellules HT-29 et les cellules SW620.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.13. Analyse quantitative des caspases 3/7 activées après inhibition de l'autophagie

Afin de confirmer le rôle de résistance de l'autophagie à l'apoptose dans cette étude, l'étude des évènements plus tardifs de l'apoptose après inhibition de l'autophagie a ainsi été réalisée. L'analyse quantitative des caspases 3/7 activées a été étudiée après traitement ou non des cellules avec la 3-MA grâce au système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte® S3 pendant 48 h **(Figures 121-123)**.

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans du milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Après 24 h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol, les cellules ont été traitées ou non avec la 3-MA, puis les cellules ont été irradiées ou non. Les cellules ont ensuite été traitées avec le réactif vert caspase 3/7 et placées dans le système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte® S3. Toutes les 2 h et pendant 48 h, des images des cellules ont été prises et la quantité de cellules exprimant une fluorescence verte a été quantifiée au cours du temps.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

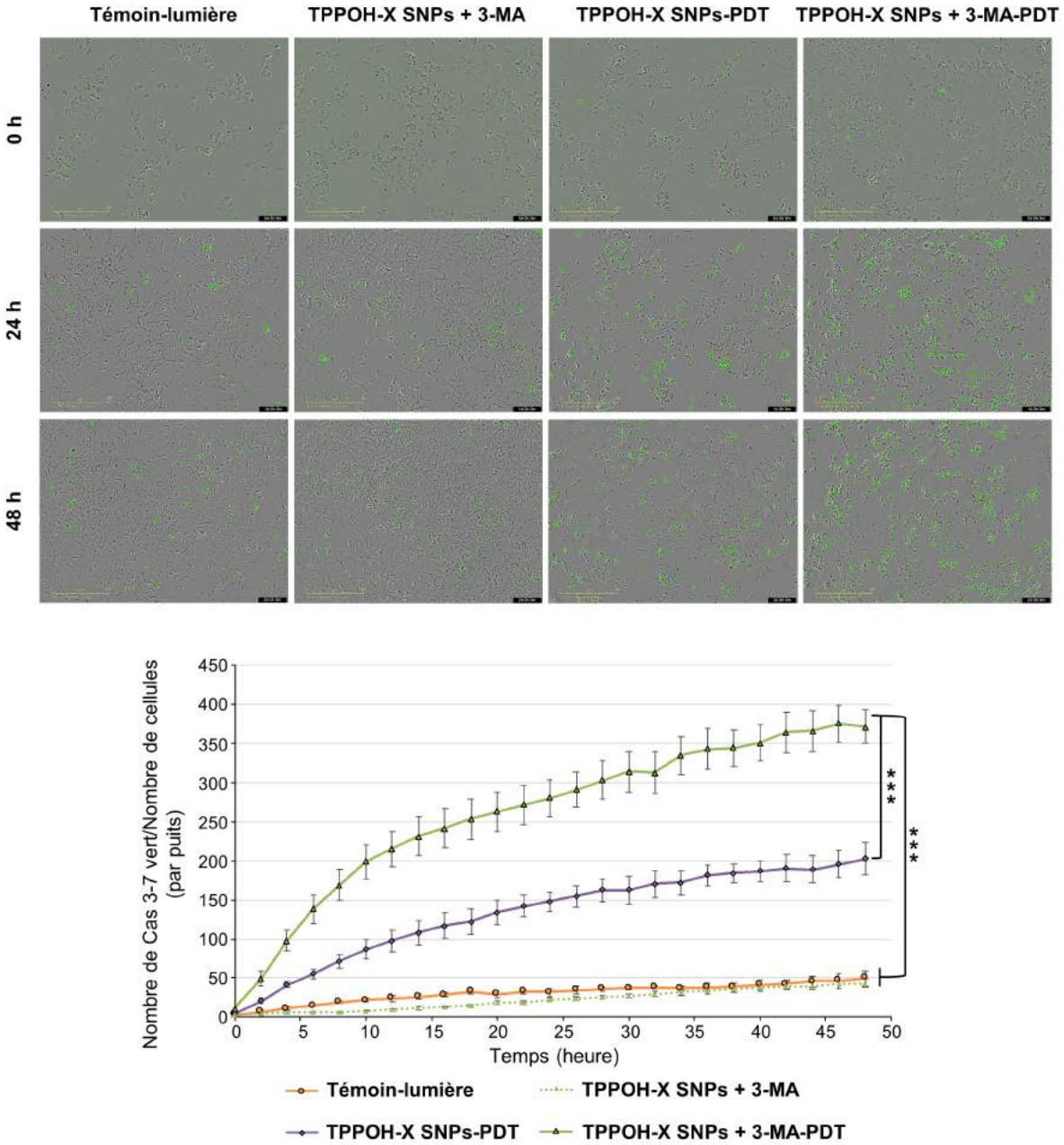


Figure 121 : analyse quantitative des caspases 3/7 activées après inhibition de l'autophagie dans les cellules HCT116

Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la 3-MA, irradiées ou non puis traitées avec le réactif vert caspase 3/7 et placées dans le système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte® S3. Toutes les 2 h, des images des cellules ont été prises à hauteur de 4 images par puits en contraste de phase et en fluorescence verte en utilisant l'objectif x10. Des images représentatives sont montrées pour chaque condition de traitement aux temps 0, 24 et 48 h. La barre d'échelle jaune représente 400 µm. La quantité de cellules en apoptose a été quantifiée avec le logiciel IncuCyte® en utilisant le rapport du nombre de cellules fluorescentes en vert normalisé par le nombre de cellules totales dans chaque puits au cours du temps sur 48 h. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 3$ et ***$p < 0{,}001$.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

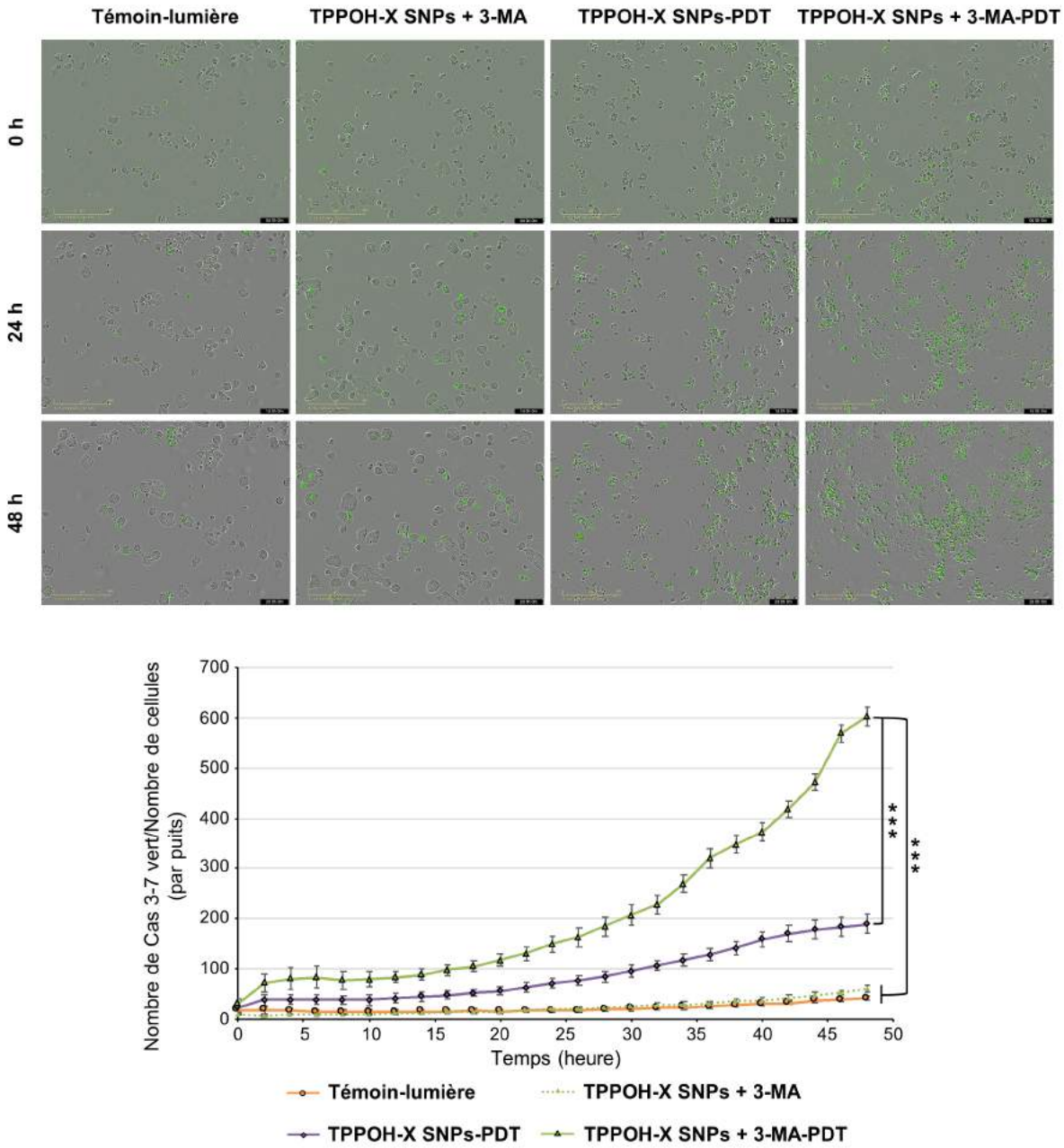


Figure 122 : analyse quantitative des caspases 3/7 activées après inhibition de l'autophagie dans les cellules HT-29

Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la 3-MA, irradiées ou non puis traitées avec le réactif vert caspase 3/7 et placées dans le système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte® S3. Toutes les 2 h, des images des cellules ont été prises à hauteur de 4 images par puits en contraste de phase et en fluorescence verte en utilisant l'objectif x10. Des images représentatives sont montrées pour chaque condition de traitement aux temps 0, 24 et 48 h. La barre d'échelle jaune représente 400 µm. La quantité de cellules en apoptose a été quantifiée avec le logiciel IncuCyte® en utilisant le rapport du nombre de cellules fluorescentes en vert normalisé par le nombre de cellules totales dans chaque puits au cours du temps sur 48 h. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 3$ et ***$p < 0{,}001$.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

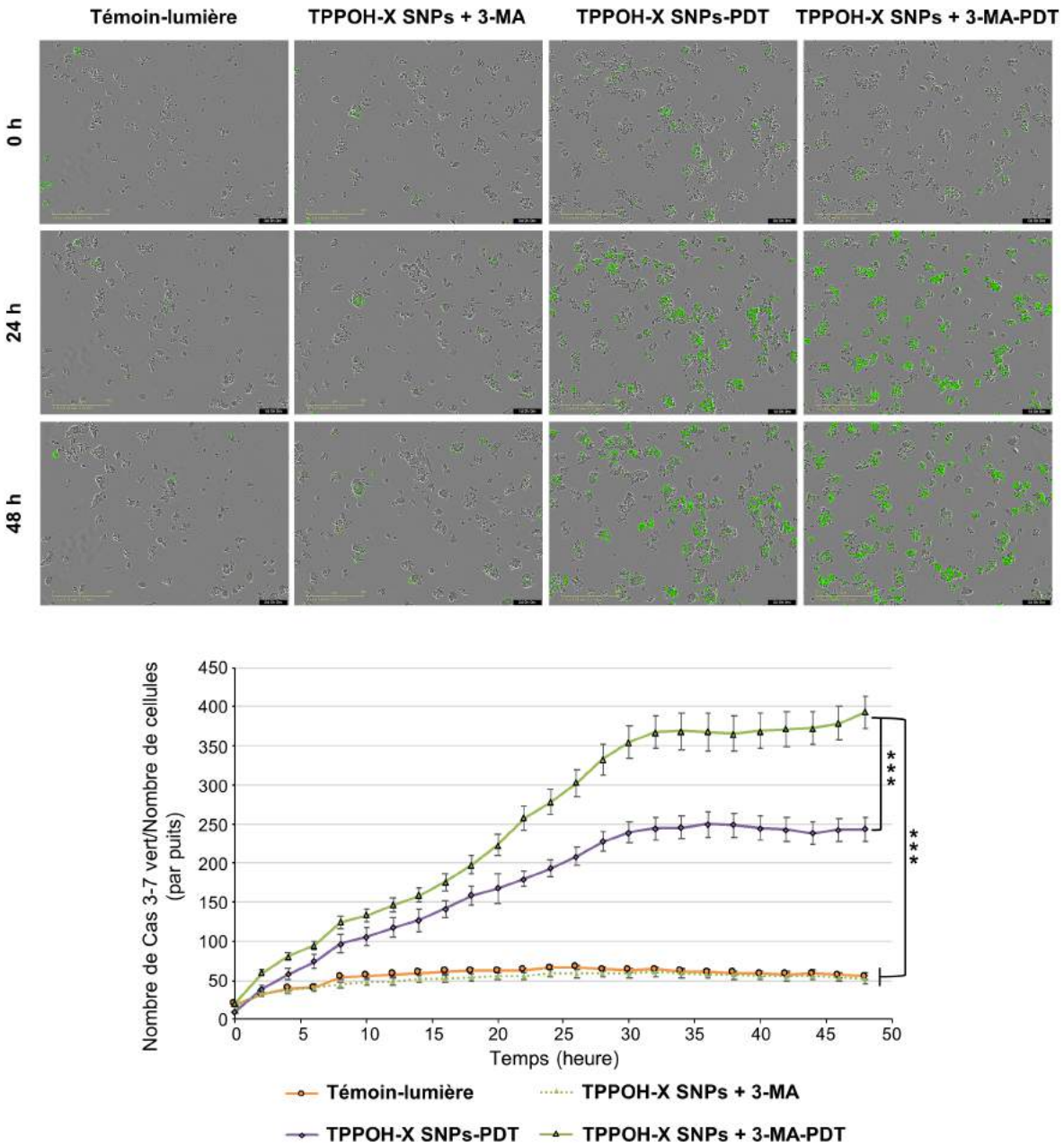


Figure 123 : analyse quantitative des caspases 3/7 activées après inhibition de l'autophagie dans les cellules SW620

Les cellules SW620 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la 3-MA, irradiées ou non puis traitées avec le réactif vert caspase 3/7 et placées dans le système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte® S3. Toutes les 2 h, des images des cellules ont été prises à hauteur de 4 images par puits en contraste de phase et en fluorescence verte en utilisant l'objectif x10. Des images représentatives sont montrées pour chaque condition de traitement aux temps 0, 24 et 48 h. La barre d'échelle jaune représente 400 µm. La quantité de cellules en apoptose a été quantifiée avec le logiciel IncuCyte® en utilisant le rapport du nombre de cellules fluorescentes en vert normalisé par le nombre de cellules totales dans chaque puits au cours du temps sur 48 h. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 3$ et ***$p < 0{,}001$.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Ces résultats montrent que l'inhibition de l'autophagie par la 3-MA permet de décupler l'augmentation de la quantité de caspases 3/7 activées induite par les TPPOH-X SNPs-PDT dans les 3 lignées cellulaires **(Figures 121-123)**. En effet, le traitement des cellules HCT116 avec les TPPOH-X SNPs + 3-MA-PDT entraîne une augmentation significative de plus de 7 fois supérieure par rapport à la condition témoin-lumière à 48 h de la quantité de caspases 3/7 activées au cours du temps **(Figure 121)**. L'inhibition de l'autophagie permet donc de décupler la quantité de caspases 3/7 activées puisqu'à 48 h, en l'absence de 3-MA, les TPPOH-X SNPs-PDT n'induisent une augmentation que de 4 fois supérieure à la condition témoin-lumière. Cependant, cette augmentation de la quantité de caspases 3/7 activées est uniquement due au rôle de résistance de l'autophagie à l'apoptose et non à la 3-MA elle-même puisque, lors du traitement des cellules HCT116 avec les TPPOH-X SNPs + 3-MA non photoactivées, aucune augmentation de la quantité de caspases 3/7 activées n'est observée par rapport à la condition témoin-lumière. Des résultats similaires sont observés pour les cellules HT-29 **(Figure 122)** et SW620 **(Figure 123)** où le co-traitement avec la 3-MA des cellules traitées avec les TPPOH-X SNPs-PDT permet l'augmentation significative de la quantité de caspases 3/7 activées, respectivement de plus de 12 et 7 fois supérieure par rapport à la condition témoin-lumière contre seulement plus de 4 fois supérieure sans co-traitement avec la 3-MA. De plus, le co-traitement avec la 3-MA lui-même, n'induit pas l'activation des caspases 3/7 puisque lorsque les cellules sont traitées avec les TPPOH-X SNPs + 3-MA non photoactivées, il n'y a pas d'augmentation de la quantité de caspases 3/7 activées par rapport à la condition témoin-lumière.

I.14. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN après inhibition de l'autophagie

La quantité des caspases effectrices 3/7 activées augmentant significativement après inhibition de l'autophagie, l'activation d'endonucléases clivant l'ADN en fragments oligo-nucléosomiques d'environ 180-200 paires de bases devrait également augmenter. L'analyse de la quantité d'ADN fragmenté après inhibition de l'autophagie a donc été étudiée afin de quantifier cette étape tardive de l'apoptose **(Figures 124-126)**.

Les cellules (HCT116, HT-29 et SW620) ont été ensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 24 h dans du milieu correspondant. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs aux IC_{50} déterminées. Après 24 h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol, les cellules ont été traitées ou non avec la 3-MA, puis les cellules ont été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont ensuite été récupérées et la fragmentation de l'ADN a été quantifiée par un test ELISA.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

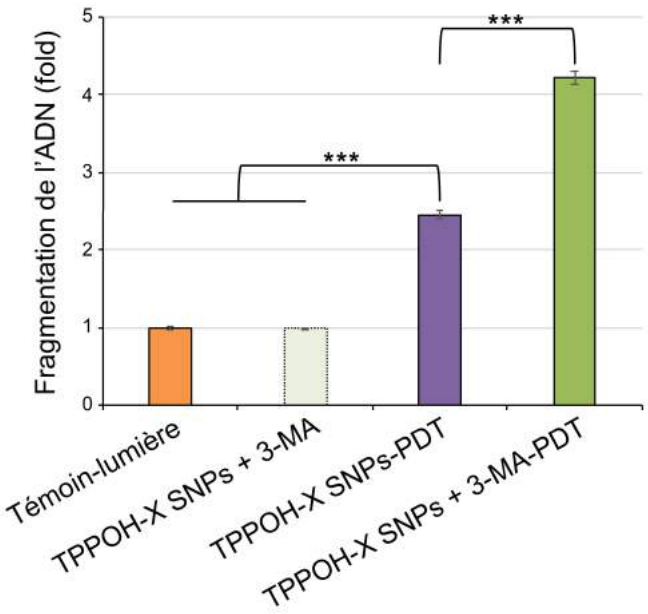


Figure 124 : analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN après inhibition de l'autophagie dans les cellules HCT116

Les cellules HCT116 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la 3-MA puis elles ont été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été récupérées et la fragmentation de l'ADN a été quantifiée par un test ELISA. La quantité d'ADN fragmenté dans la condition témoin-lumière est normalisée à 1 et celle des conditions traitées est exprimée en n-fold comparé à la condition témoin-lumière. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 3$ et ***$p < 0,001$.

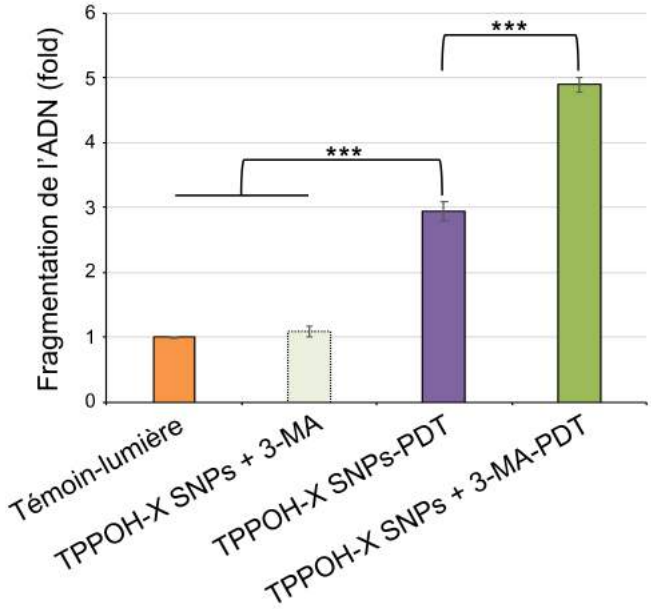


Figure 125 : analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN après inhibition de l'autophagie dans les cellules HT-29

Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la 3-MA puis elles ont été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été récupérées et la fragmentation de l'ADN a été quantifiée par un test ELISA. La quantité d'ADN fragmenté dans la condition témoin-lumière est normalisée à 1 et celle des conditions traitées est exprimée en n-fold comparé à la condition témoin-lumière. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 3$ et ***$p < 0,001$.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

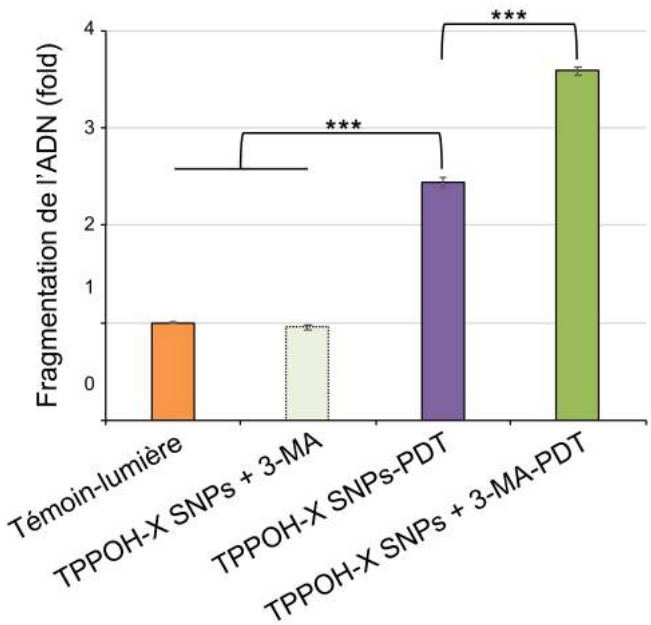


Figure 126 : analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN après inhibition de l'autophagie dans les cellules SW620

Les cellules SW620 ont été traitées ou non avec les TPPOH-X SNPs à l'IC_{50} déterminée pendant 24 h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la 3-MA puis elles ont été irradiées ou non. Après 48 h, les cellules ont été récupérées et la fragmentation de l'ADN a été quantifiée par un test ELISA. La quantité d'ADN fragmenté dans la condition témoin-lumière est normalisée à 1 et celle des conditions traitées est exprimée en n-fold comparé à la condition témoin-lumière. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 3$ et ***$p < 0,001$.

Ces résultats montrent que l'inhibition de l'autophagie par la 3-MA permet de décupler l'augmentation de la fragmentation de l'ADN induite par les TPPOH-X SNPs-PDT dans les 3 lignées cellulaires **(Figures 124-126)**. En effet, le traitement des cellules HCT116 avec les TPPOH-X SNPs-PDT entraîne une augmentation significative de la quantité d'ADN fragmenté de 2,5 fois par rapport à la condition témoin-lumière. En revanche, lorsque pour ce même traitement, les cellules HCT116 sont co-traitées avec la 3-MA, l'ADN fragmenté augmente plus fortement d'une valeur significative de plus de 4 fois supérieure à la condition témoin-lumière **(Figure 124)**. Cependant, cette augmentation de la fragmentation de l'ADN est uniquement due au rôle de résistance de l'autophagie à l'apoptose et non à la 3-MA elle-même car, lors du traitement des cellules HCT116 avec les TPPOH-X SNPs + 3-MA non photoactivées, aucune augmentation de la quantité d'ADN n'est observée par rapport à la condition témoin-lumière. Des résultats similaires sont observés pour les cellules HT-29 **(Figure 125)** et les cellules SW620 **(Figure 126)** où le co-traitement avec la 3-MA des cellules traitées avec les TPPOH-X SNPs-PDT permet l'augmentation significative de la fragmentation de l'ADN respectivement d'environ 5 et 3,5 fois supérieure par rapport à la condition témoin-lumière contre seulement 2,9 et 2,4 fois supérieure sans co-traitement avec la 3-MA. De plus, le co-traitement avec la 3-MA lui-même, n'induit pas de fragmentation de l'ADN puisque lorsque les cellules sont traitées avec les TPPOH-X SNPs + 3-MA non photoactivées, il n'y a pas d'augmentation de la fragmentation de l'ADN par rapport à la condition témoin-lumière.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Chapitre II. Expérimentations *in vivo*

I.1. Étude de la croissance tumorale

Afin de déterminer l'efficacité phototoxique des différents traitements sur la croissance tumorale *in vivo*, un modèle de xénogreffe sous-cutanée de CCR humain a été utilisé. Les cellules HT-29, la lignée cellulaire la plus résistante dans cette étude, ont été injectées de chaque côté de la région dorsale de souris femelles immunodéficientes. Lorsque les tumeurs ont atteint un volume de l'ordre de 100 à 150 mm^3, les souris ont été traitées par injection au niveau de la veine caudale d'une dose de 1/100ème de la LD_{50} pour chaque groupe contenant la TPPOH. Après 24 h, une seule tumeur par souris a été irradiée afin de comparer l'efficacité de la photoactivation intra-individu. Pour le groupe TPPOH-X SNPs multi, le même protocole de traitement et d'irradiation a été effectué tous les 5 j. La croissance tumorale **(Figure 127)** et le poids corporel des souris **(Figure 128)** ont été mesurés tous les 2 j pendant 20 j.

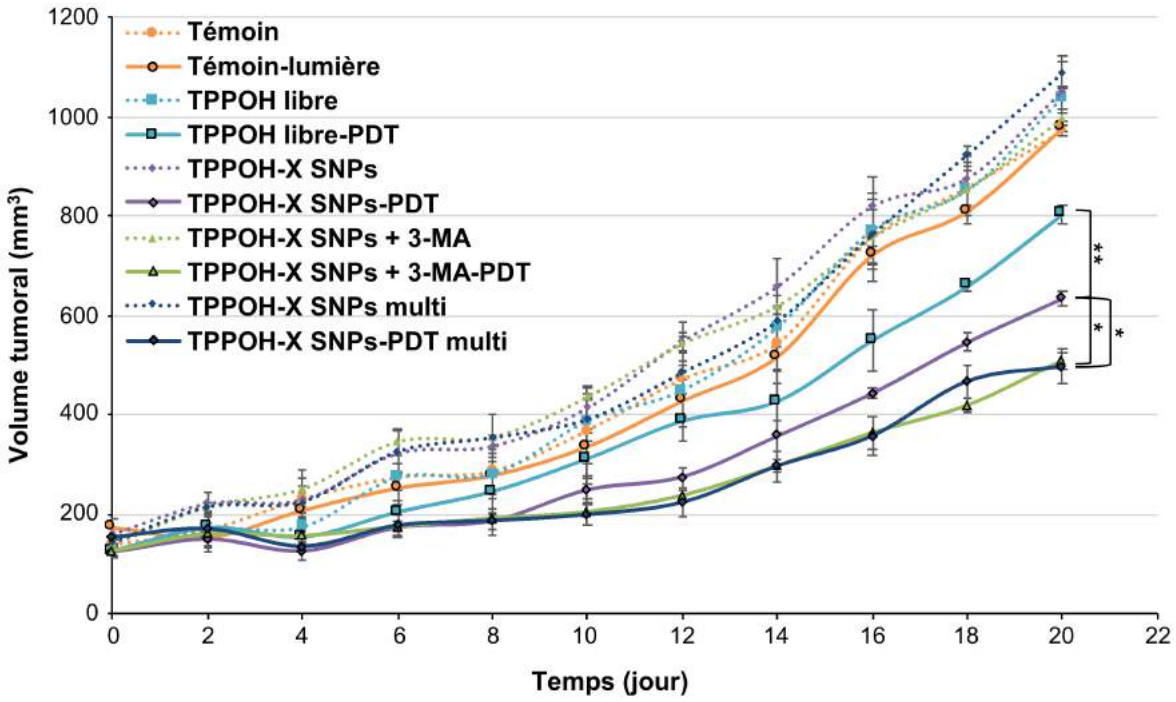


Figure 127 : étude de la croissance tumorale

Après traitement et irradiation des différents groupes de souris, la croissance tumorale a été mesurée tous les 2 j pendant 20 j. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 5$ et $*p < 0,05$; $**p < 0,01$.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

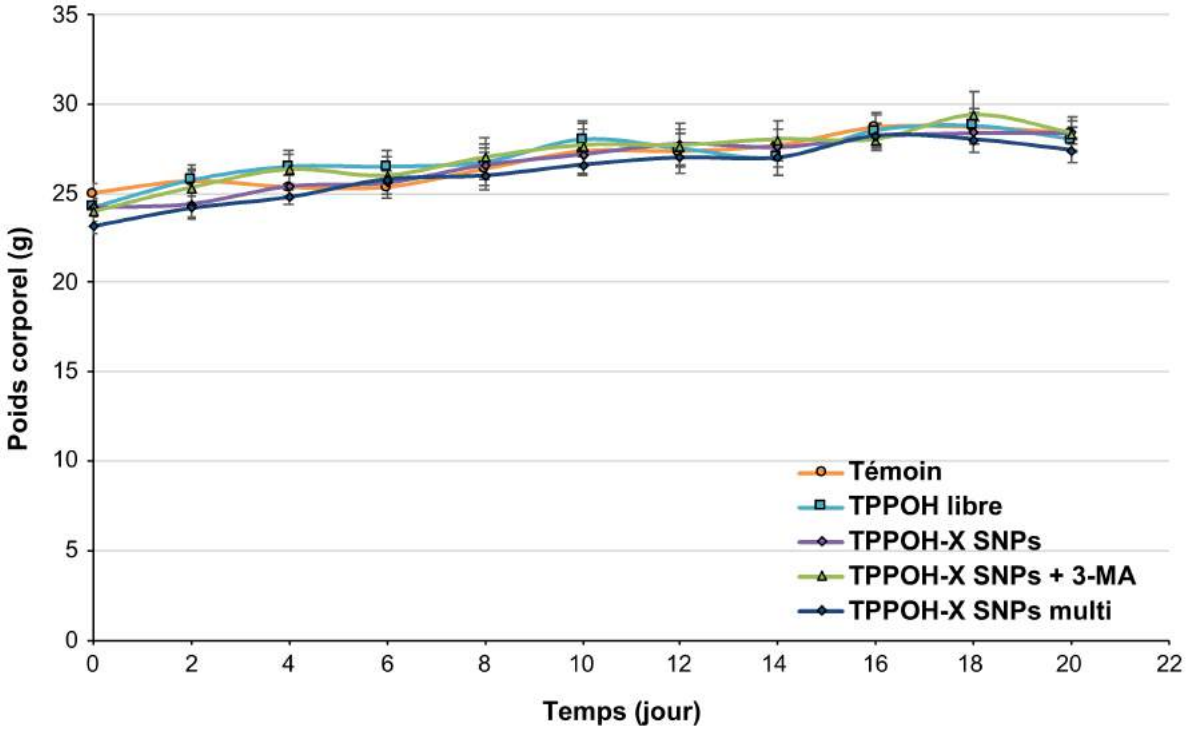


Figure 128 : étude du poids corporel

Après traitement et irradiation des différents groupes de souris, le poids corporel des souris a été mesuré tous les 2 j pendant 20 j. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec n ≥ 5.

Ces résultats montrent une efficacité anti-tumorale relative des différents traitements uniquement après photoactivation **(Figure 127)**. Dans le groupe témoin, aucune différence significative sur le volume tumoral n'est observée entre les tumeurs non-irradiées et irradiées. La croissance tumorale est rapide et importante dès l'implantation de la greffe. Ce résultat démontre que le protocole d'irradiation ne permet pas de diminuer la tumorigénicité. En revanche, les traitements contenant de la TPPOH après photoactivation permettent une réduction du volume tumoral en comparaison des mêmes traitements non photoactivés, mais avec des différences significatives. En effet, ces différents traitements photoactivés permettent d'induire un ralentissement de la croissance tumorale environ 2 à 4 j après l'irradiation. Après 20 j d'étude de la croissance tumorale, la TPPOH libre-PDT induit une réduction significative du volume tumoral de 22,5% par rapport aux tumeurs traitées avec la TPPOH libre mais non irradiées. En revanche, les TPPOH-X SNPs-PDT quant à elles induisent une réduction du volume tumoral significativement plus importante que la TPPOH libre-PDT. En effet, les TPPOH-X SNPs-PDT permettent une diminution significative du volume tumoral de 37,7% par rapport au même traitement non photoactivé. Comme observé *in vitro*, l'inhibition de l'autophagie permet d'augmenter l'efficacité anti-tumorale des TPPOH-X SNPs-PDT. En effet, le volume tumoral est significativement diminué de 49% lorsque les tumeurs sont co-traitées avec les TPPOH-X SNPs + 3-MA-PDT par rapport aux tumeurs traitées avec les TPPOH-X SNPs + 3-MA. Le co-traitement avec la 3-MA des TPPOH-X SNPs-PDT permet une diminution significative du volume tumoral de 19,9% par rapport aux TPPOH-X SNPs-PDT.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Enfin, le multitraitement avec les TPPOH-X SNPs-PDT présente également une forte efficacité anti-tumorale puisqu'il permet de diminuer de 54,5% le volume tumoral par rapport aux multitraitements non photoactivés. Malgré son efficacité plus importante par rapport au mono-traitement avec les TPPOH-X SNPs-PDT avec une diminution de plus de 22,1% du volume tumoral, le multitraitement ne permet pas d'induire plusieurs ralentissements de la croissance tumorale comme espéré. De plus, aucune différence significative n'est observée sur le poids corporel des souris au cours de l'étude selon les différents traitements démontrant leur absence de toxicité systémique **(Figure 128)**.

Afin de respecter les règles éthiques en vigueur, les souris ont été sacrifiées et photographiées après 20 j d'étude, et les tumeurs ont été recueillies, photographiées et pesées **(Figures 129-130)**.

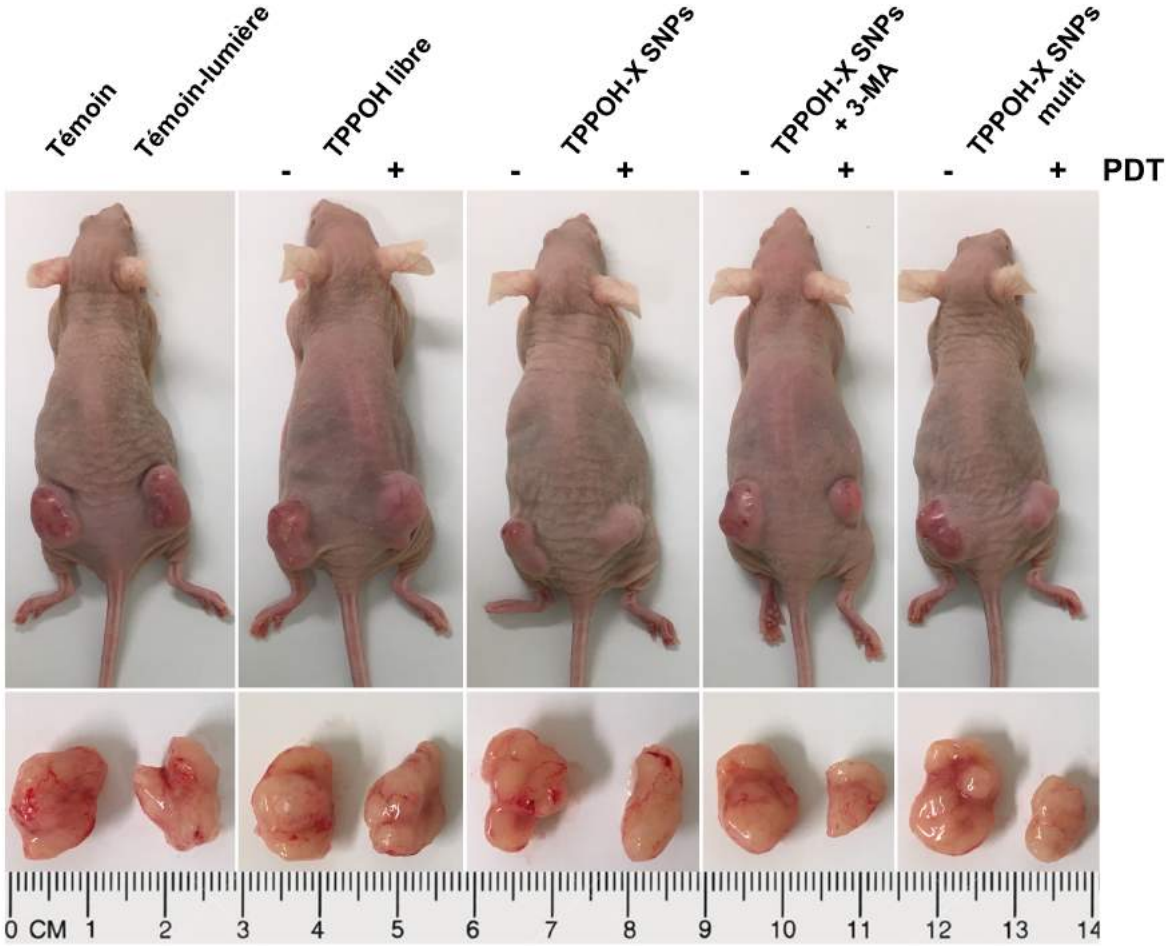


Figure 129 : photographies des souris et des tumeurs à la fin de l'étude

À la fin de l'étude, les souris des différents groupes de traitements ont été photographiées. Après sacrifice des souris, les tumeurs de chaque condition de traitement ont été extraites puis photographiées. Des images représentatives sont visualisées.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

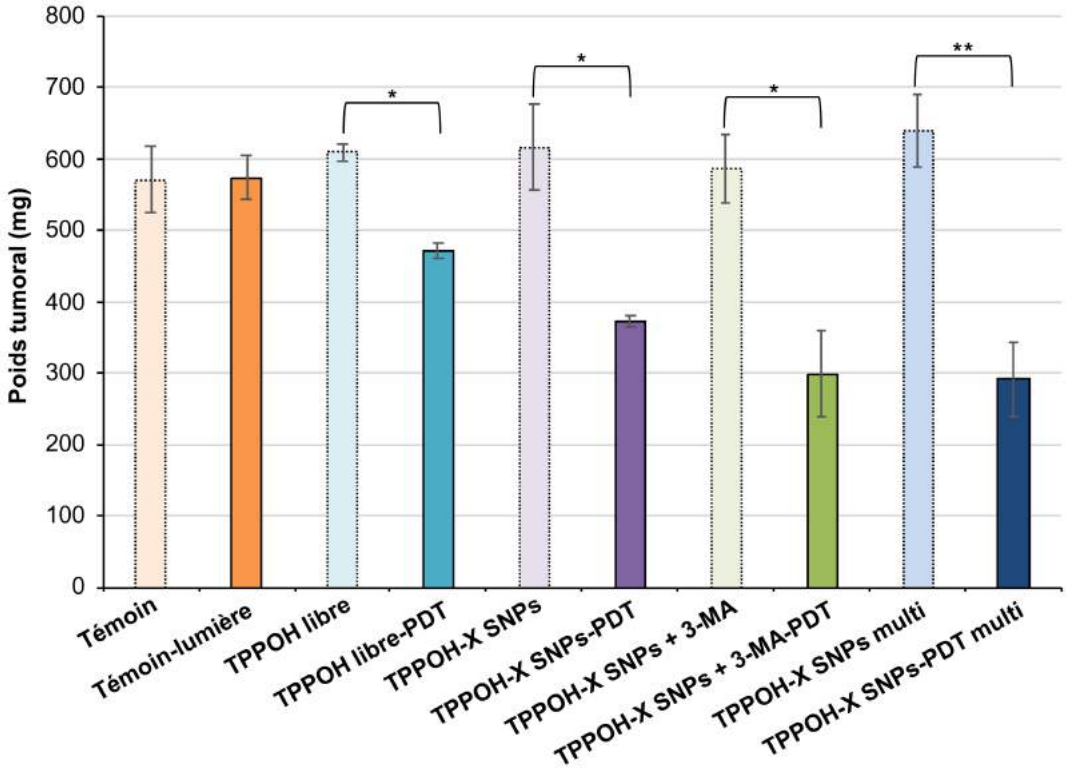


Figure 130 : étude du poids tumoral à la fin de l'étude

Après sacrifice des souris, les tumeurs de chaque condition de traitement ont été extraites puis pesées. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 5$ et $*p < 0,05$; $**p < 0,01$.

Ces résultats montrent que, dans tous les groupes traités avec de la TPPOH photoactivée, le poids des tumeurs est significativement diminué par rapport au groupe témoin ou aux groupes contenant de la TPPOH mais non photoactivée **(Figure 130)**. Ces résultats suivent la même tendance que le volume tumoral, résultats observables également au niveau des photographies représentatives à la fin de l'étude des souris et des tumeurs *ex-vivo* **(Figure 129)**.

I.2. Étude de la morphologie et de la structure des tumeurs

Afin d'étudier la morphologie et la structure des tumeurs 24 h après traitement ou non par PDT, une souris par groupe de traitement a été sacrifiée, puis les tumeurs ont été extraites, fixées et incluses en paraffine. Les tumeurs ont ensuite été coupées puis colorées à l'HES **(Figure 131)**. La coloration HES est une coloration trichromatique dite topographique, c'est à dire qu'elle permet d'avoir une vue d'ensemble de la morphologie et de la structure cellulaire d'un tissu. L'hématoxyline, colorant cationique, possède une affinité pour les éléments cellulaires chargés négativement dits basophiles. Il colore notamment les noyaux en bleu/violet en se fixant sur les acides nucléiques. À l'inverse, l'éosine est un colorant anionique qui possède une affinité pour les éléments cellulaires chargés positivement dits éosinophiles. L'éosine colore notamment le cytoplasme en rose et les autres éléments cellulaires basiques en rose/rouge selon leur acidophilie. Le safran, quant à lui, permet de colorer en jaune les fibres de collagène des tissus conjonctifs.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

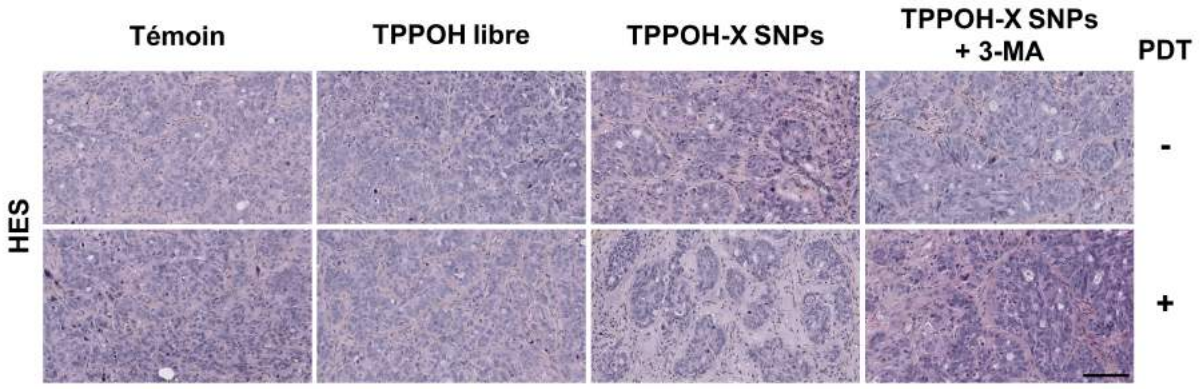


Figure 131 : étude de la morphologie et de la structure des tumeurs

24 h après traitement ou non par PDT, les tumeurs, selon les différentes conditions de traitements, ont été extraites, fixées, incluses en paraffine puis coupées. Les coupes histologiques de tumeurs ont ensuite été colorées avec l'HES afin de déterminer la morphologie et la structure. Des images représentatives sont montrées et la barre d'échelle représente 10 µm.

Ces résultats montrent une diminution de la densité cellulaire et une augmentation de la fibrose tumorale à la suite des traitements photoactivés contenant de la TPPOH **(Figure 131)**. Ces observations qui sont le signe de lésions tissulaires causées par des dommages oxydatifs sont très marquées notamment dans les groupes de traitements contenant les TPPOH-X SNPs-PDT +/- 3-MA.

I.3. Étude du niveau d'apoptose dans les tumeurs

Afin de déterminer la mise en place du processus apoptotique dans les tumeurs selon les conditions de traitements 24 h après irradiation ou non par PDT, les coupes histologiques de tumeurs ont été marquées par la technique TUNEL **(Figure 132)**. Ce marquage TUNEL permet la détection de la fragmentation de l'ADN. Cette technique repose sur l'utilisation d'une enzyme, la Tdt, qui catalyse la fixation de désoxynucléotides marqués d'un anticorps couplé à la peroxydase au 3'-hydroxyle terminal des cassures de l'ADN double brin générées lors de l'apoptose. Le marquage marron est donc révélateur de cellules contenant de l'ADN fragmenté.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

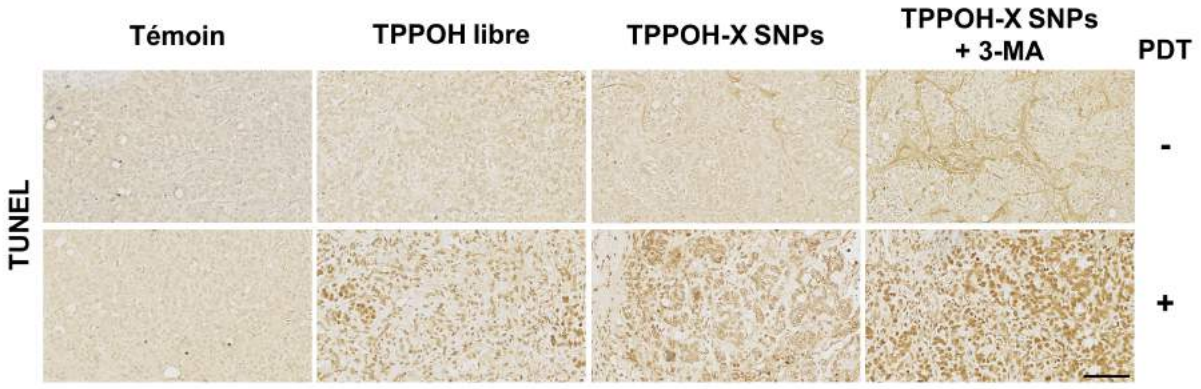


Figure 132 : étude du niveau d'apoptose dans les tumeurs

24 h après traitement ou non par PDT, les tumeurs, selon les différentes conditions de traitements, ont été extraites, fixées, incluses en paraffine puis coupées. Les coupes histologiques de tumeurs ont ensuite été marquées grâce à la technique TUNEL afin de déterminer le niveau d'apoptose. Des images représentatives sont montrées et la barre d'échelle représente 10 µm.

Ces résultats montrent une augmentation de la fragmentation de l'ADN à la suite des traitements photoactivés contenant de la TPPOH **(Figure 132)**. Néanmoins, le marquage TUNEL est beaucoup plus présent dans les tumeurs traitées avec les TPPOH-X SNPs-PDT qu'avec la TPPOH libre-PDT. De plus, c'est dans les tumeurs traitées avec les TPPOH-X SNPs + 3-MA-PDT que la fragmentation de l'ADN est la plus présente. L'augmentation de la fragmentation de l'ADN est révélatrice de la mise en place du processus apoptotique dans les tumeurs. Le traitement avec les TPPOH-X SNPs + 3-MA-PDT est donc le traitement le plus cytotoxique, résultat concordant avec l'étude sur la croissance tumorale où ce même traitement induit sa diminution significative comparé aux autres traitements.

I.4. Étude du niveau d'autophagie dans les tumeurs

Afin de déterminer le niveau d'autophagie dans les tumeurs selon les conditions de traitements 24 h après traitement ou non par PDT, les coupes histologiques de tumeurs ont été marquées avec un anticorps dirigé contre la protéine LC3 **(Figure 133)**. Le marquage marron est donc révélateur de cellules en autophagie.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

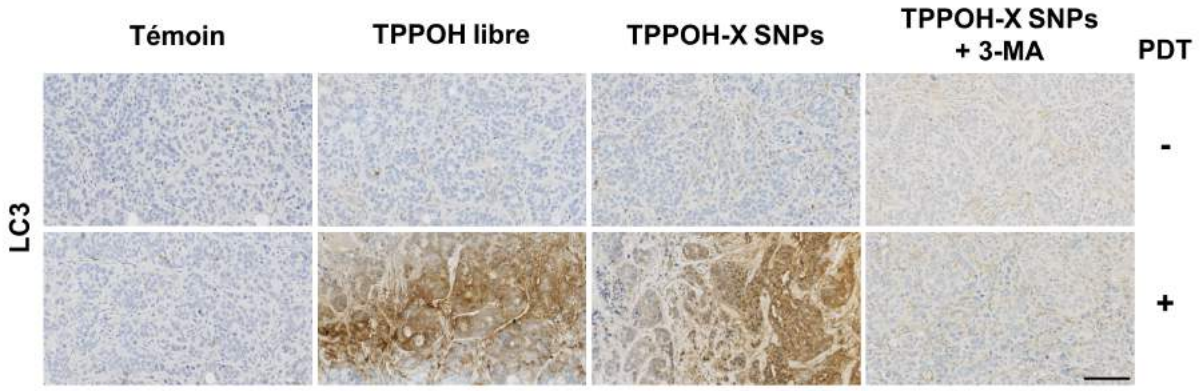


Figure 133 : étude du niveau d'autophagie dans les tumeurs

24 h après traitement ou non par PDT, les tumeurs, selon les différentes conditions de traitements, ont été extraites, fixées, incluses en paraffine puis coupées. Les coupes histologiques de tumeurs ont ensuite été marquées avec un anticorps dirigé contre la protéine LC3 afin de déterminer le niveau d'autophagie. Des images représentatives sont montrées et la barre d'échelle représente 10 µm.

Ces résultats montrent, comme observé *in vitro*, une augmentation de l'autophagie lorsque les souris sont traitées avec les traitements contenant de la TPPOH photoactivée **(Figure 133)**. En revanche, après co-traitement avec les TPPOH-X SNPs-PDT et la 3-MA, le marquage de la protéine LC3 est fortement diminué. La 3-MA permet donc bien de diminuer le niveau d'autophagie dans les tumeurs.

I.5. Étude de la morphologie et de la structure des tumeurs en fin d'étude

Après 20 j d'étude, certaines conditions de traitements induisent une diminution de la croissance tumorale d'environ 50%. Afin d'étudier l'impact des traitements sur la morphologie et la structure des tumeurs à la fin de l'étude, les souris ont été sacrifiées puis les tumeurs ont été extraites, fixées et incluses en paraffine. Les tumeurs ont ensuite été coupées puis colorées à l'HES **(Figure 134)**.

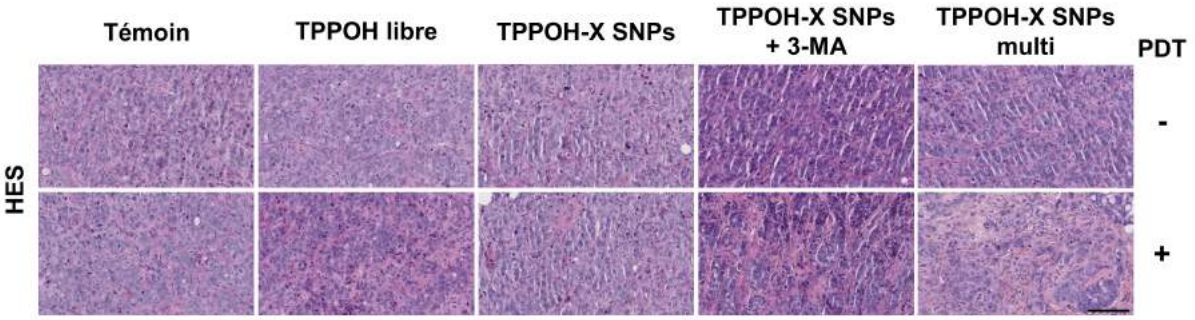


Figure 134 : étude de la morphologie et de la structure des tumeurs à la fin de l'étude

En fin d'étude, les tumeurs, selon les différentes conditions de traitements, ont été extraites, fixées, incluses en paraffine puis coupées. Les coupes histologiques de tumeurs ont ensuite été colorées avec l'HES afin de déterminer la morphologie et la structure. Des images représentatives sont montrées et la barre d'échelle représente 10 µm.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Ces résultats montrent, comme pour les coupes histologiques de tumeurs 24 h après traitement ou non par PDT, une diminution de la densité cellulaire et une augmentation de la fibrose tumorale à la suite des traitements photoactivés contenant de la TPPOH **(Figure 134)**. Ces observations qui sont le signe de lésions tissulaires causées par des dommages oxydatifs sont très marquées notamment dans les groupes de traitements avec les TPPOH-X SNPs + 3-MA-PDT et les multitraitements avec les TPPOH-X SNPs-PDT. Ces résultats sont concordants avec l'étude de la croissance tumorale car ce sont ces 2 conditions de traitements pour lesquelles l'efficacité anti-tumorale est la plus importante.

I.6. Étude de la prolifération des cellules tumorales en fin d'étude

Afin d'étudier l'impact des traitements sur la prolifération des cellules tumorales à la fin de l'étude, les coupes histologiques de tumeurs ont été marquées par un anticorps dirigé contre la protéine nucléolaire reconnue par l'anticorps Ki-67 **(Figure 135)**. Le marquage marron est donc révélateur de cellules en prolifération.

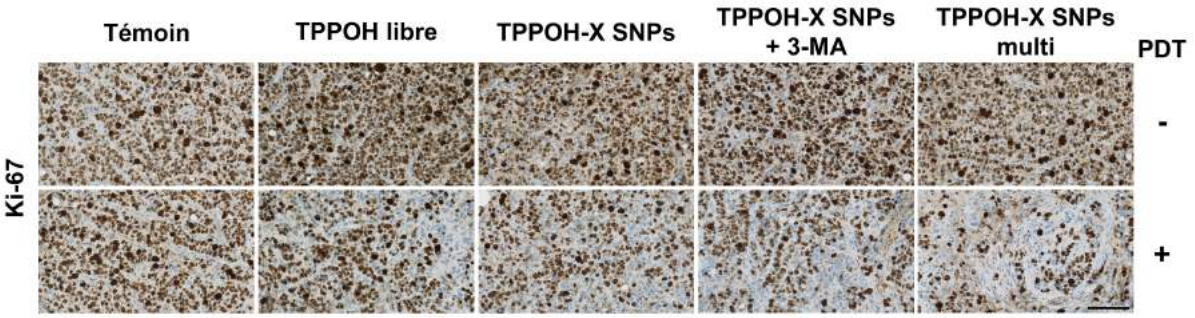


Figure 135 : étude de la prolifération des cellules tumorales à la fin de l'étude

En fin d'étude, les tumeurs, selon les différentes conditions de traitements, ont été extraites, fixées, incluses en paraffine puis coupées. Les coupes histologiques de tumeurs ont ensuite été marquées avec un anticorps dirigé contre la protéine nucléolaire reconnue par l'anticorps Ki-67 afin de déterminer la prolifération des cellules tumorales. Des images représentatives sont montrées et la barre d'échelle représente 10 µm.

Ces résultats montrent une diminution de la prolifération des cellules tumorales lorsque les souris sont traitées avec de la TPPOH photoactivée **(Figure 135)**. Ces observations sont en totale adéquation avec, tout d'abord, les résultats observés lors de l'étude de la morphologie et de la structure des tumeurs où une diminution de la densité cellulaire et une augmentation de la fibrose tumorale sont décrites après traitement avec de la TPPOH photoactivée. De plus, ces observations concordent avec l'étude sur la croissance tumorale où le traitement avec les TPPOH-X SNPs + 3-MA-PDT et les multitraitements avec les TPPOH-X SNPs-PDT induisent la plus forte activité anti-tumorale, comme observé dans cette figure où, dans ces mêmes conditions de traitements, la prolifération des cellules tumorales est la plus diminuée.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.7. Étude de la biodistribution

Comme évoqué précédemment, les nanoparticules sont capables de s'accumuler préférentiellement au niveau du site tumoral grâce à l'effet EPR. La biodistribution de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs a donc été analysée **(Figure 136)**. Ces molécules ont été marquées avec la cyanine 5.5 afin de les suivre par fluorescence avec le système « IVIS Lumina quantitative fluorescence imaging system ». Le spectre d'émission naturel de la TPPOH se superposant avec celui de l'hémoglobine, le suivi par fluorescence de ces molécules n'était pas possible sans marquage avec un fluorochrome. La biodistribution de ces molécules a été analysée 24 h après l'injection des traitements d'abord sur les souris entières **(Figure 136 A)**. Ensuite, les souris ont été sacrifiées et la biodistribution *ex vivo* au niveau des tumeurs et des organes majeurs a été analysée avec le même système **(Figure 136 B)**. Enfin, l'intensité relative du signal de fluorescence dans les tumeurs et dans les organes a été calculée afin de quantifier la présence de molécules dans ces différents tissus **(Figure 136 C)**.

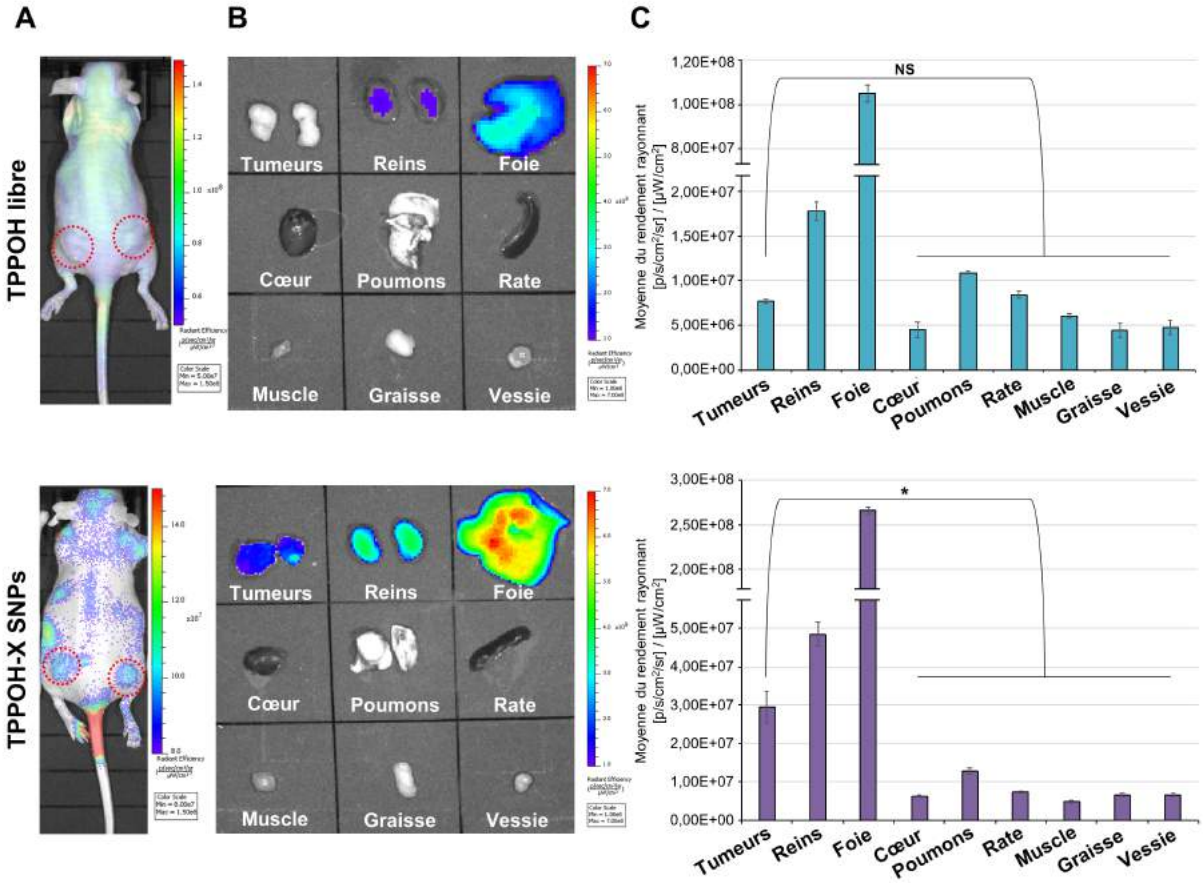


Figure 136 : étude de la biodistribution *in vivo* et *ex vivo*

A : Images *in vivo* de détection de fluorescence de la cyanine 5.5 dans les souris entières selon les conditions de traitements 24 h après l'injection. Les cercles rouges indiquent les sites tumoraux. **B** : Images *ex vivo* de détection de fluorescence de la cyanine 5.5 des tumeurs et des organes majeurs 24 h après l'injection des traitements. **C** : Quantification du signal de fluorescence de la cyanine 5.5 dans les différents tissus 24 h après l'injection des traitements. Des images représentatives sont visualisées. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec $n \geq 3$ et $*p < 0,05$; NS : non significatif.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Ces résultats montrent un fort signal de fluorescence au niveau des sites tumoraux lorsque les souris sont traitées avec les TPPOH-X SNPs **(Figure 136A)**. En revanche, le signal de fluorescence est beaucoup plus diffus au niveau du corps entier lorsque les souris sont traitées avec la TPPOH libre. La détection de la fluorescence de la cyanine 5.5 étant révélatrice de la biodistribution des traitements TPPOH libre et TPPOH-X SNPs, la vectorisation de la TPPOH permet donc un ciblage tumoral plus important. Afin de confirmer cette observation, les tumeurs et les organes majeurs ont été extraits puis la fluorescence de la cyanine 5.5 a été analysée **(Figure 136B)**. Que ce soit pour la TPPOH libre ou les TPPOH-X SNPs, ces 2 traitements s'accumulent préférentiellement au niveau du foie et des reins. En effet, il est connu que, comme ces 2 organes filtrent le sang, l'accumulation de nombreux traitements est majoritaire au niveau de ces derniers. En revanche, lorsque les souris sont traitées avec les TPPOH-X SNPs, une fluorescence est détectée au niveau des tumeurs alors qu'elle n'est pas présente ni dans les autres organes ni lorsque les souris sont traitées avec la TPPOH libre. Afin de déterminer précisément la biodistribution de ces 2 traitements, la présence de fluorescence de la cyanine 5.5 a été quantifiée dans ces différents tissus **(Figure 136C)**. Mise à part une forte accumulation des 2 traitements dans le foie et dans les reins, les TPPOH-X SNPs s'accumulent de façon significativement supérieure au niveau des tumeurs par rapport aux autres organes alors que ce n'est pas le cas pour la TPPOH libre. La vectorisation de la TPPOH permet donc un ciblage tumoral préférentiel.

I.8. Étude de la biocompatibilité

Les traitements utilisés dans cette étude s'accumulant de façon majoritaire au niveau du foie et des reins, la toxicité systémique potentielle de ces derniers a été analysée **(Figure 137)**. À la fin de l'étude, lorsque les souris ont été sacrifiées, les reins, le foie, les poumons, le cœur et la rate de chaque condition de traitements ont été extraits, fixés et inclus en paraffine. Les différentes coupes histologiques ont ensuite été coupées puis colorées à l'HES afin de déterminer de potentiels dommages sur la morphologie et la structure de ces tissus.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

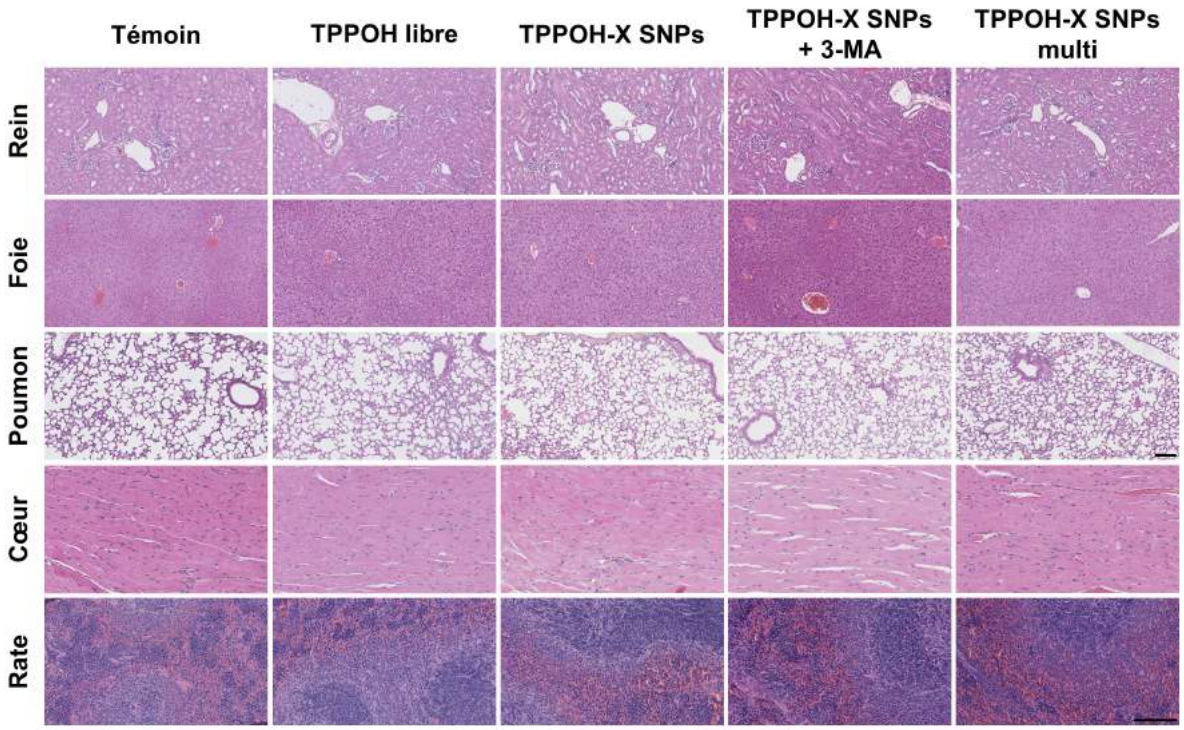


Figure 137 : étude de la biocompatibilité des différents traitements

En fin d'étude, les organes majeurs des souris des différents groupes de traitements ont été extraits, fixés, inclus en paraffine puis coupés. Les coupes histologiques de ces organes ont ensuite été colorées avec l'HES afin de déterminer l'impact des différents traitements sur la morphologie et la structure. Des images représentatives sont visualisées et la barre d'échelle représente 10 µm.

Ces résultats montrent que, quel que soit le traitement utilisé, aucun dommage tissulaire n'est observé par rapport à la condition témoin **(Figure 137)**. Malgré l'injection répétée des TPPOH-X SNPs, SNPs étant connues pour induire des problèmes hépatiques et rénaux à des doses importantes, aucune différence significative n'a été observée notamment au niveau de l'inflammation et de la régénération hépatique ou d'une insuffisance rénale. Ces résultats démontrent l'efficacité anti-tumorale des TPPOH-X SNPs qui possèdent une bonne biocompatibilité malgré leur forte accumulation au niveau hépatique et rénal.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Discussion

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.1. Intérêt de la vectorisation de la TPPOH par des SNPs

Malgré l'intérêt grandissant de cette nouvelle stratégie thérapeutique anticancéreuse, notamment par sa forte diminution des effets secondaires pour les patients, la PDT se heurte à plusieurs problèmes majeurs limitant son utilisation en clinique. L'un de ces problèmes est l'utilisation de PS, comme les porphyrines, qui possèdent une forte hydrophobicité dans les milieux physiologiques limitant fortement leur biodistribution. De plus, les PS, tout comme les chimiothérapies conventionnelles, possèdent une très faible sélectivité vis à vis des tumeurs. En comparaison des chimiothérapies actuellement utilisées en clinique, les PS ne vont pas induire de dommages cytotoxiques au niveau de l'organisme mais leur mauvaise biodistribution et leur mauvais ciblage tumoral vont fortement diminuer leur index thérapeutique.

Afin d'améliorer la biodistribution des PS hydrophobes vers leurs sites cibles, la nanomédecine par leur vectorisation sur des nanoparticules semble être une stratégie très prometteuse. En effet, les nanoparticules, par encapsulation ou recouvrement de leur surface avec des PS, permettent un ciblage préférentiel des sites tumoraux grâce à l'effet EPR mais également une amélioration de l'hydrophilicité des PS donc par conséquent de leur biodistribution dans les tissus physiologiques. L'association de PS sur des nanoparticules devrait donc améliorer l'index thérapeutique par rapport aux PS non vectorisés.

En effet, Roy *et al.* ont démontré que l'encapsulation de l'HPPH dans des SNPs d'environ 30 nm augmente de façon significative la pénétration cellulaire ainsi que la mort cellulaire induite après photoactivation par rapport à l'HPPH libre dans des lignées cellulaires de cancer des ovaires et de cancer du col de l'utérus (133). Des résultats similaires ont été rapportés par Secret *et al.* sur une lignée cellulaire de cancer du sein avec l'utilisation d'une porphyrine anionique greffée sur des NPs de silicium poreux (236). D'autres études utilisant cette fois-ci une chlorine comme PS ont démontré l'augmentation de la pénétration cellulaire et une diminution significative de la viabilité cellulaire après PDT lorsque la Ce6 est vectorisée sur des SNPs par rapport à sa forme libre sur des lignées cellulaires de glioblastome (237) et de cancer du sein (238). De plus, Brezániová *et al.* ont montré que la vectorisation de la témoporfin par des SNPs augmente également la pénétration cellulaire ainsi que la mort cellulaire de lignées cellulaires humaines de cancers du sein *in vitro* mais également *in vivo* sur des xénogreffes sous-cutanées induites par les cellules MDA-MB-231. Ils ont rapporté que l'augmentation de l'efficacité anticancéreuse de la témoporfin vectorisée par rapport à sa forme libre est due à l'amélioration du ciblage tumoral grâce à l'effet EPR induit par les SNPs (239). Par ailleurs, des résultats similaires ont été démontrés par Simon *et al.* grâce à la vectorisation de la PpIX sur les SNPs. Ils ont démontré *in vitro* sur les cellules HCT116 et les cellules HT-29 une augmentation de l'accumulation intracellulaire de la PpIX vectorisée par rapport à sa forme libre ainsi qu'une augmentation de l'activité anticancéreuse. De plus, *in vivo*, à partir de xénogreffes sous-cutanées induites par les cellules de CCR humain HCT116, ils ont montré une meilleure sélectivité envers les sites tumoraux lorsque la PpIX est vectorisée avec les SNPs (159).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Dans notre étude, il a été déterminé l'intérêt de la vectorisation de la TPPOH sur des SNPs par rapport à la TPPOH libre. Comme démontré dans la littérature, il a été observé que la vectorisation de la TPPOH sur des SNPs permet d'améliorer son index thérapeutique par rapport à sa forme libre. En effet, *in vitro* sur des lignées cellulaires humaines de CCR, les TPPOH-X SNPs-PDT induisent une diminution de l'IC_{50} de plus de 10 fois pour les cellules HT-29 et d'environ 40 fois pour les cellules HCT116 et les cellules SW620 par rapport à la TPPOH libre-PDT. L'augmentation de l'efficacité anticancéreuse des TPPOH-X SNPs-PDT par rapport à la TPPOH libre-PDT *in vitro*, est certainement due à l'amélioration de la biodistribution lorsque la TPPOH est vectorisée. En effet, quel que soit le temps de traitement, les TPPOH-X SNPs pénètrent beaucoup plus facilement dans les lignées cellulaires humaines de CCR qu'avec la TPPOH libre, avec respectivement plus de 97% de cellules contenant le PS vectorisé contre moins de 3% des cellules quand le PS est sous sa forme libre. *In vivo*, des résultats similaires ont été observés. Le traitement des tumeurs avec les TPPOH-X SNPs-PDT permet une augmentation de l'efficacité anticancéreuse par rapport à la TPPOH libre-PDT avec une diminution de la croissance tumorale de plus de 37% contre seulement 22,5% avec la TPPOH libre photoactivée. Cette amélioration de l'efficacité anticancéreuse lorsque la TPPOH est vectorisée est due à l'augmentation du ciblage tumoral par les SNPs. En effet, hormis le foie et les reins, les études de biodistribution montrent que, lorsque la TPPOH est vectorisée, elle est significativement plus présente dans les tumeurs par rapport aux autres organes, ce qui n'est pas le cas pour la TPPOH libre. Que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, la vectorisation de la TPPOH par les SNPs permet donc d'améliorer l'index thérapeutique de ce PS notamment par l'amélioration de sa biodistribution et son ciblage tumoral.

Afin de limiter l'opsonisation hépatique des NPs pour augmenter leur durée de vie dans la circulation sanguine, les NPs sont généralement recouvertes de chaînes de polymères hydrophiles comme le PEG. Malgré l'intérêt important du PEG, l'effet mémoire envers les groupements PEG limite son action pour des traitements répétés. Dans notre étude, le xylane, une hémicellulose naturelle, biodégradable et non toxique a été choisi à la place du PEG. En plus de sa potentielle action de furtivité pour les NPs, le xylane a été démontré comme jouant un rôle dans l'amélioration de la biodistribution de molécules anticancéreuses hydrophobes. En effet, Sauraj *et al.* ont démontré une augmentation de l'efficacité anticancéreuse du 5-FU (146) et de la curcumine (147) lorsque ces derniers étaient vectorisés par des NPs de xylane par rapport à leur forme libre sur des lignées cellulaires de CCR humain HT-29 et HCT-15.

Dans nos travaux de recherche, la comparaison de l'efficacité anticancéreuse des TPPOH-X SNPs par rapport aux TPPOH SNPs n'a pas été étudiée. En revanche, la décoration des SNPs par le xylane afin d'augmenter leur furtivité par rapport à l'opsonisation hépatique semble peu efficace. Malgré l'amélioration du ciblage tumoral lorsque la TPPOH est vectorisée sur les SNPs grâce à l'effet EPR, les TPPOH-X SNPs sont préférentiellement localisées au niveau hépatique avec un facteur d'au moins 8 fois supérieur aux tumeurs.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.2. Biocompatibilité et toxicité des SNPs

Malgré l'intérêt majeur de l'utilisation de NPs afin d'améliorer l'hydrophilicté des PS utilisés en PDT ainsi que d'augmenter le ciblage tumoral de ces derniers pour améliorer leur index thérapeutique, la biocompatibilité et la toxicité des NPs sont souvent remises en question. En effet, il est largement montré dans la littérature que les NPs inorganiques telles que les NPs de fer ou d'or sont très peu dégradables dans le temps ce qui conduit à leur mauvaise biocompatibilité. En revanche, il a été démontré que les SNPs sont l'un des types de NPs inorganiques les plus biocompatibles. La toxicité des NPs en général dépend surtout de la dose administrée. De plus, des résultats contradictoires sont retrouvés dans la littérature car la toxicité des NPs est également dépendante du type de matériel utilisé, de la taille des NPs ainsi que du type cellulaire étudié (240–242).

En effet, il a été démontré par Liu *et al.* que les SNPs de 20 nm induisent de façon dose dépendante l'apoptose des cellules endothéliales humaines de la veine du cordon ombilical à partir de 100 µg/mL (243). À l'inverse, Sergent *et al.* ont montré que les SNPs de 25 nm n'induisent pas de cytotoxicité dans les cellules de CCR humain HT-29 jusqu'à 150 µg/mL et que les SNPs de 100 nm quant à elles n'induisent qu'une légère cytotoxicité de moins de 10% dans les mêmes conditions (244). Cho *et al.* se sont intéressés à l'impact de la taille des SNPs sur leur biodistribution et sur les lésions tissulaires engendrées *in vivo*. Ils ont montré que, quelle que soit la taille des SNPs (50, 100 ou 200 nm), elles s'accumulent au niveau du foie et de la rate mais seules les SNPs de 100 et 200 nm induisent une inflammation hépatique à une dose de 50 mg/kg. De plus, ils ont démontré que plus la taille des SNPs est faible, plus leur clairance est rapide (245). De façon opposée, Kumar *et al.* ont montré que les SNPs de 20 nm s'accumulent dans plusieurs organes notamment au niveau du foie et de la rate mais également au niveau de l'estomac, des reins, des poumons et du cœur mais sans induire la moindre toxicité à la dose de 2 mg/kg (246). La taille des SNPs est importante mais la question qui prédomine est la dose injectée. À l'inverse des conclusions émises par Cho *et al.* où leurs SNPs de 100 ou 200 nm induisent des dommages hépatiques à une dose de 50 mg/kg, Chan *et al.* ont démontré qu'une injection intraveineuse de SNPs de 150 nm n'induit pas d'effet toxique *in vivo* jusqu'à une dose de 300 mg/kg (247). De plus, Liu *et al.* ont montré que, dans les mêmes conditions en utilisant des SNPs de 110 nm, les SNPs n'induisent pas d'effet toxique jusqu'à une dose de 500 mg/kg. Ils ont même prouvé que des doses quotidiennes de SNPs à 20, 40 ou 80 mg/kg pendant 14 j ne conduisent à aucune toxicité. Ils ont déterminé la LD_{50} des SNPs en une seule injection à plus de 1 g/kg (248).

Dans notre travail, la biocompatibilité et la toxicité des SNPs de 80 nm ont été analysées *in vitro* et *in vivo*. Il a été démontré que les SNPs de 80 nm n'induisent pas de cytoxicité. En effet, *in vitro*, les SNPs n'induisent aucun effet sur la viabilité des 3 lignées cellulaires de CCR humain à des concentrations allant jusqu'à 175 µg/mL pour les cellules HT-29 et jusqu'à 35 µg/mL pour les cellules HCT116 et les cellules SW620. De façon plus précise, la biocompatibilité des SNPs a été analysée par MET. Le traitement des cellules par les SNPs aux IC_{50} déterminées n'induit pas d'apoptose ou d'autophagie dans les cellules, puisqu'elles montrent une morphologie normale avec des structures cellulaires intactes et des noyaux non endommagés.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

In vivo, la biocompatibilité et la toxicité des SNPs de 80 nm n'a pas directement été analysée mais elle a été déduite grâce à la TPPOH vectorisée par les SNPs. L'unique injection de TPPOH-X SNPs à une dose contenant 334 mg/kg de SNPs ou les injections répétées de TPPOH-X SNPs tous les 5 j n'induisent pas de toxicité *in vivo*. Par rapport à la toxicité des SNPs démontrée dans la littérature, cette dose de 334 mg/kg reste faible comparé à la LD_{50} de 1 g/kg. De plus, les injections répétées de SNPs tous les 5 j, soit une quantité totale injectée de 1,34 g/kg donc supérieure à la LD_{50}, auraient pu induire une toxicité, mais la clairance importante des SNPs a dû diminuer la quantité de SNPs présente dans l'organisme à la suite de ces injections répétées. La biocompatibilité des SNPs a été analysée par l'observation de la morphologie et de la structure des organes majeurs, notamment le foie et les reins où elles s'accumulent préférentiellement. L'analyse histologique n'a pas révélée de différence par rapport à la condition témoin même lors des injections répétées. En effet, les traitements non biocompatibles induisent généralement une inflammation hépatique démontrée par la présence importante de lymphocytes conduisant à la régénération des cellules du foie, observée par la présence de nombreuses cellules en mitose, mais également une insuffisance rénale mise en évidence notamment par une glomérulosclérose peu importante et une atrophie tubulaire conduisant à l'augmentation de la fibrose interstitielle. Que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, les SNPs utilisées dans notre étude montrent une bonne biocompatibilité et une absence de toxicité renforçant l'intérêt de leur utilisation afin d'améliorer la PDT à visée anticancéreuse.

I.3. Mécanismes de mort cellulaire induits par la PDT

Les dommages cellulaires induits après la PDT impliquent souvent les processus de mort cellulaire telle que la nécrose ou l'apoptose. La nécrose est généralement accompagnée d'une perte de l'intégrité de la membrane plasmique et de l'homéostasie métabolique due à une désintégration cellulaire immédiate et incontrôlée. Cette voie de mort cellulaire est associée à des changements morphologiques caractéristiques comme notamment le gonflement cellulaire et la rupture de la membrane plasmique. En général, la nécrose se produit dans les cellules qui ont été traitées avec des doses importantes de PS ou irradiées avec une forte fluence (249). Le mécanisme de mort cellulaire souvent décrit après la PDT est l'apoptose. L'apoptose implique la destruction contrôlée des cellules et l'internalisation des composants cellulaires dans des corps apoptotiques qui vont ensuite être phagocytés. Le processus apoptotique est morphologiquement caractérisé par la rétractation cellulaire ainsi que des changements cellulaires distinctifs comme la condensation de la chromatine, la fragmentation du noyau ou encore l'internalisation de différentes parties de la cellule dans des corps apoptotiques (166). La PDT induit la mort cellulaire grâce à la génération d'ERO. Il a été démontré que lorsque ces ERO sont générées au niveau des mitochondries ou du cytoplasme, elles permettent l'induction de l'apoptose. En effet, cette génération d'ERO induit l'ouverture des pores dans la membrane mitochondriale conduisant à l'activation des caspases et donc de l'apoptose (250,251).

Plusieurs auteurs ont montré que des dérivés de la TPP activés par PDT induisent la mort cellulaire par apoptose. En effet, Baldea *et al.* ont démontré que la méso-5,10,15,20-tetrakis (4-hydroxyphényl) porphyrine (THOPP) induit l'apoptose par l'activation de la voie caspase-dépendante d'une lignée cellulaire de mélanome après PDT (252).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Roby *et al.* ont quant à eux montré que la TPP libre ou lorsqu'elle est chargée sur des micelles de PEG-PE induit l'apoptose de la lignée cellulaire murine de cancer du poumon de Lewis (253). Liao *et al.* ont eux rapporté que des dérivés de la TPP possédant des groupements piperidine induisent la mort cellulaire par apoptose *in vitro* sur la lignée cellulaire humaine QBC-939 de cholangiocarcinome mais également *in vivo* sur des xénogreffes sous-cutanées induites par ces mêmes cellules (254). Des résultats similaires ont été mis en évidence par Wu *et al.* à la suite d'un traitement composé en partie de TPP activée par PDT *in vitro* sur une lignée cellulaire humaine HeLa de cancer du col de l'utérus mais également *in vivo* sur des xénogreffes sous-cutanées induites par ces mêmes cellules (255).

Nous avons démontré que les TPPOH-X SNPs induisent la mort cellulaire par apoptose à partir de la génération d'ERO après photoactivation. En effet, les TPPOH-X SNPs sont préférentiellement localisées au niveau des lysosomes. Leur photoactivation induisant la génération d'ERO, les TPPOH-X SNPs-PDT entraînent l'ouverture des pores de la membrane mitochondriale déstabilisant le $\Delta\Psi m$, comme observé dans la littérature. En effet, le traitement des 3 lignées cellulaires utilisées avec les TPPOH-X SNPs-PDT induit une déstabilisation du $\Delta\Psi m$ mise en évidence grâce à la sonde JC-1. Cette déstabilisation conduit à l'activation des caspases effectrices 3 et 7 ainsi qu'à l'augmentation de la fragmentation de l'ADN. De plus, suite à l'analyse en MET, les cellules traitées avec les TPPOH-X SNPs-PDT montrent les caractéristiques morphologiques des cellules en apoptose, comme notamment la rétractation cellulaire, la condensation nucléaire ainsi que la formation de corps apoptotiques. *In vivo*, l'efficacité anticancéreuse des TPPOH-X SNPs est induite par l'augmentation du processus apoptotique détecté par le marquage TUNEL. Que ce soit *in vitro* ou *in vivo* sur un modèle de CCR humain, les TPPOH-X SNPs-PDT induisent la mort cellulaire par apoptose.

I.4. Mécanisme de résistance à l'apoptose induite par la PDT

De nombreuses études ont démontré, après PDT, l'activation de l'autophagie résultant de la production d'ERO dans les cellules cancéreuses. L'autophagie est un processus physiologique essentiel qui permet de maintenir l'homéostasie cellulaire en recyclant les composants cellulaires ou les organelles non fonctionnels ou altérés (256). Le rôle exact de l'autophagie est très controversé par la communauté scientifique. En effet, l'autophagie peut jouer un rôle majeur dans la mort cellulaire programmée mais de façon opposée elle peut également jouer un rôle dans le processus de survie cellulaire.

De nombreuses études ont démontré le rôle cytoprotecteur de l'autophagie dans la mort cellulaire induite par PDT. En effet, Xue *et al.* ont démontré que la Ce6 photoactivée induit l'apoptose et l'autophagie dans les cellules de CCR SW620 par l'augmentation de l'expression de la forme active de la caspase 3 ainsi que de l'augmentation de la conversion de la forme LC3-I en LC3-II. Après l'inhibition de l'autophagie par la 3-MA, ils ont montré une augmentation significative de la mort cellulaire par apoptose dans cette lignée cellulaire (227). Des résultats similaires ont été rapportés par Xiong *et al.* avec une augmentation du nombre de vacuoles autophagiques sur les cellules HCT116 et les cellules SW620 de CCR après traitement avec la polyhématoporphyrine (Photosan-II) photoactivée.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Après un co-traitement avec un inhibiteur de l'autophagie, la chloroquine, ils ont démontré une augmentation importante de la mort cellulaire par apoptose. De plus, ils ont montré une diminution significative de la croissance tumorale induite par des xénogreffes sous-cutanées lors du co-traitement avec l'inhibiteur de l'autophagie en comparaison au traitement photoactivé seulement (257). Wei *et al.* ont rapporté des conclusions similaires *in vitro* et *in vivo* lors de traitement avec la PpIX photoactivée et l'inhibition de l'autophagie avec des inhibiteurs pharmacologiques ou par délétion génétique du gène *Atg5* sur des lignées cellulaires de CCR humain (228). En revanche, quelques études ont montré le rôle cytotoxique de l'autophagie après PDT. Ces auteurs ont démontré que l'inhibition de l'autophagie diminue significativement la cytotoxicité et l'apoptose de lignées cellulaires humaines d'ostéosarcome (226) et de cancer du sein (258) après traitement par PDT.

Nos résultats démontrent que l'autophagie joue un rôle de résistance à l'apoptose. En effet, l'autophagie est activée *in vitro* après traitement avec les TPPOH-X SNPs-PDT, ceci par l'augmentation de l'expression des protéines de l'autophagie, notamment LC3 ainsi que la conversion de sa forme I en sa forme II. L'activation de l'autophagie a également été mise en évidence par la présence de nombreuses vacuoles autophagiques contenant des organelles ou des fragments cellulaires ainsi que des autophagosomes à double membrane. L'autophagie est également activée *in vivo* après traitement avec les TPPOH-X SNPs-PDT, ceci par l'augmentation du marquage immunohistologique des protéines LC3 dans les tumeurs induites par xénogreffes sous-cutanées. L'inhibition de l'autophagie par la 3-MA permet d'augmenter l'activité anticancéreuse des TPPOH-X SNPs-PDT *in vitro* sur les lignées cellulaires de CCR humain. De plus, le co-traitement avec la 3-MA *in vivo* entraîne une diminution significative de la croissance tumorale comparée au traitement avec les TPPOH-X SNPs-PDT sans co-traitement. Que ce soit *in vitro* ou *in vivo*, ces résultats montrent le rôle de résistance de l'autophagie envers la mort cellulaire induite par apoptose des TPPOH-X SNPs-PDT.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Conclusions et perspectives

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Actuellement, l'un des problèmes majeurs des traitements conventionnels comme les chimiothérapies est le très mauvais ciblage de ces traitements envers les cellules tumorales diminuant fortement leur index thérapeutique et entraînant de nombreux effets secondaires chez les patients. La PDT, par l'utilisation de PS non cytotoxiques en l'absence de photoactivation, à l'inverse des chimiothérapies, ainsi que par leur activation focalisée, permet de limiter fortement les effets secondaires indésirables. Cependant, les PS souffrent d'une mauvaise biodistribution dans les milieux physiologiques ainsi que d'un mauvais ciblage tumoral. C'est pourquoi dans cette étude la combinaison de la PDT avec la nanomédecine a été étudiée. En effet par l'utilisation de nanoparticules, la nanomédecine permet un ciblage préférentiel des sites tumoraux grâce à l'effet EPR. Il a été démontré *in vivo* une amélioration significative de l'efficacité anticancéreuse des TPPOH-X SNPs-PDT par rapport à la TPPOH libre-PDT grâce à un meilleur ciblage tumoral lorsque le PS est vectorisé par les SNPs. Même si *in vitro* il a été montré une internalisation cellulaire significativement plus importante avec les TPPOH-X SNPs par rapport à la TPPOH libre, cette augmentation est uniquement due à l'amélioration de la biodistribution par l'augmentation de l'hydrophilicité de la TPPOH lorsqu'elle est vectorisée sur les SNPs par rapport à sa forme libre. Effectivement, l'effet EPR n'est pas détectable *in vitro*. La combinaison de la PDT avec la nanomédecine permet donc de diminuer fortement les effets secondaires indésirables grâce à l'amélioration du ciblage tumoral par rapport aux traitements chimiothérapeutiques conventionnels. Cependant, apporter de façon importante le PS nanovectorisé au niveau de la tumeur grâce à l'effet EPR est une avancée, mais si le PS ne s'internalise pas de façon importante dans les cellules cancéreuses, l'index thérapeutique du PS ne sera pas efficient.

Afin d'améliorer ce projet de recherche, il serait intéressant d'envisager un greffage de molécules spécifiques des cellules cancéreuses comme les acides foliques sur les TPPOH-X SNPs. En effet, toutes les cellules vivantes nécessitent des apports en vitamines comme l'acide folique. De par leur division importante, les cellules cancéreuses ont un besoin particulièrement plus élevé en vitamines. Il a été démontré que les récepteurs aux acides foliques sont surexprimés dans de nombreux cancers, par exemple jusqu'à plus de 100 fois pour les cellules cancéreuses ovariennes par rapport aux cellules saines (69). Il a été mis en évidence l'intérêt du greffage des acides foliques sur les MSNs encapsulant le 5-ALA (259). En effet, cette étude a montré une efficacité anticancéreuse plus importante du nanoobjet 5-ALA/MSNs/PEG/acides foliques par rapport au 5-ALA libre sur une lignée cellulaire de mélanome de la peau. Cette amélioration est bien due à l'augmentation de l'internalisation cellulaire par les récepteurs aux acides foliques, l'internalisation cellulaire de ce nanoobjet étant beaucoup plus faible sur des cellules ne surexprimant pas les récepteurs aux acides foliques. Un ciblage spécifique des cellules cancéreuses permet donc d'améliorer l'index thérapeutique d'un traitement mais entraîne également de possibles résistances. En effet, une tumeur étant un ensemble très hétérogène, il est possible que certaines cellules cancéreuses ne surexpriment pas le récepteur aux acides foliques diminuant l'efficacité anticancéreuse du traitement. Il est donc nécessaire d'envisager des combinaisons de ciblage spécifiques des cellules cancéreuses en associant le greffage des acides foliques avec par exemple des anticorps monoclonaux à la surface des SNPs. En effet, il a été montré l'intérêt du greffage du cétuximab, anticorps monoclonal ciblant l'EGFR, sur les MSNs encapsulant la phtalocyanine zinguée (260).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Cette étude a démontré une efficacité anticancéreuse plus importante lorsque les MSNs sont décorées de cétuximab par rapport aux MSNs dépourvues de cétuximab sur des lignées cellulaires humaines de cancer du pancréas.

Après un ciblage cellule spécifique, il est envisageable de cibler préférentiellement des organelles cellulaires afin d'accroître la cytotoxicité du traitement. La mitochondrie par exemple est l'organite central dans le phénomène de mort cellulaire programmée. De par son implication dans divers processus physiologiques tels que la production d'énergie ou d'ERO, sa déstabilisation va engendrer la mort de la cellule. Il a été démontré que la fonctionnalisation de molécules avec le cation triphénylphosphonium facilite leur passage à travers la bicouche lipidique de la mitochondrie (261). L'augmentation de l'efficacité anticancéreuse après fonctionnalisation par le cation triphénylphosphonium des nanoparticules de BSA/phéophorbide a/acides foliques a été montrée *in vivo* sur des xénogreffes sous-cutanées induites par des cellules de mélanome de la peau (262). En effet, lorsque le traitement contient l'agent de ciblage mitochondrial, la croissance tumorale est significativement diminuée d'un facteur 4 par rapport au même traitement sans ciblage mitochondrial. Cette perspective a déjà été mise en place au laboratoire avec des résultats préliminaires très prometteurs. En effet, la TPPOH libre et les TPPOH-X SNPs ont été fonctionnalisées par le cation triphénylphosphonium et testées sur les lignées cellulaires de CCR humain HCT116 et HT-29. Pour les cellules HCT116, les IC_{50} déterminées sont de 0,53 µM et 10,1 nM respectivement pour la TPPOH libre et les TPPOH-X SNPs par rapport à 3 µM et 72,6 nM sans ciblage mitochondrial. Des résultats similaires sont observés pour les cellules HT-29 avec des IC_{50} déterminées de 1,62 µM et 175 nM respectivement pour la TPPOH libre et les TPPOH-X SNPs par rapport à 6 µM et 550 nM sans ciblage mitochondrial. Le ciblage mitochondrial dans ces cellules a été confirmé par microscopie confocale. Ces résultats préliminaires renforcent l'intérêt d'un ciblage d'organelle cellulaire en plus de la combinaison de la PDT et de la nanomédecine afin d'accroître l'efficacité anticancéreuse du traitement.

Dans nos travaux de recherche, l'efficacité anticancéreuse du traitement est essentiellement due à la combinaison de la PDT avec la nanomédecine car elle permet aux TPPOH-X SNPs de s'accumuler préférentiellement au niveau du site tumoral par rapport à la TPPOH libre. Néanmoins, la localisation des TPPOH-X SNPs se situe majoritairement au niveau hépatique et rénal. L'intérêt de la décoration des SNPs par des chaînes de polymères hydrophiles et flexibles comme le PEG, afin de les rendre plus furtives, a déjà été démontré. En effet, Kramer *et al.* ont montré dans une étude de biodistribution comparant les MSNs et les MSNs-PEGylées que la PEGylation permet de diminuer fortement la localisation hépatique ainsi que d'augmenter le ciblage tumoral (263). Malgré la possibilité d'un effet mémoire envers les groupements PEG lors de traitements répétés, la décoration des SNPs par les groupements PEG semble intéressante. Dans notre étude, le choix de la décoration des SNPs avec du xylane à la place du PEG n'a pas permis de rendre très furtive les TPPOH-X SNPs par rapport à l'opsonisation hépatique. Dans un premier temps, il serait intéressant de comparer la biodistribution des SNPs décorées par le xylane ou non afin de conclure sur son impact par rapport à la furtivité des SNPs.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

De plus, il serait efficient de comparer les SNPs décorées par le xylane à des SNPs décorées avec des PEG afin de déterminer le meilleur agent de furtivité en incluant des comparaisons entre injection unique et injections répétées afin de déterminer l'importance de l'effet ABC envers les SNPs-PEGylées lors d'injections répétées. La biodistribution des SNPs dans les organes est importante mais le temps de biodistribution l'est également. En effet, le protocole de PDT utilisé dans notre projet de recherche consiste en une injection intraveineuse des TPPOH-X SNPs puis, après 24 h de biodistribution, l'irradiation des tumeurs. Cependant, nous n'avons aucune donnée sur le temps nécessaire des TPPOH-X SNPs pour s'accumuler significativement au niveau tumoral. Il pourrait donc être très intéressant de réaliser des études de biodistribution de ce traitement dans le temps afin de déterminer la fenêtre temporelle dans laquelle l'accumulation des TPPOH-X SNPs au niveau tumoral est la plus forte améliorant ainsi l'efficacité anticancéreuse du traitement.

La longueur d'onde d'irradiation utilisée lors de la PDT peut également être discutée. En effet, le pic d'absorption majoritaire des PS que ce soit des porphyrines ou des chlorines correspond à la bande de Soret dans le bleu-violet aux alentours de 425 nm. Cependant, la longueur d'onde d'irradiation approuvée en clinique pour la majorité des traitements en PDT se situe dans le rouge aux alentours de 630/750 nm (264), du fait de sa meilleure pénétration dans les tissus (265). La lumière bleue ne pénètre que jusqu'à la limite de l'épiderme et du derme alors que la lumière rouge pénètre plus en profondeur jusqu'à l'hypoderme d'un facteur au moins 5 fois supérieur par rapport à la lumière bleue. Les études précliniques en PDT utilisent majoritairement la lumière rouge en se positionnant sur la meilleure pénétration de la lumière dans les tissus. Néanmoins, les porphyrines ne possèdent qu'un très faible pic d'absorption dans le rouge et les chlorines un pic d'absorption dans le rouge un peu plus important mais toujours de façon minoritaire par rapport à la bande de Soret. La question qui se pose est donc : faut-il mieux photoactiver très peu de PS mais en profondeur dans la tumeur ou photoactiver beaucoup de PS mais uniquement en surface de la tumeur ? Actuellement, selon les recommandations de la FDA, c'est la pénétration de la lumière qui prime. C'est donc pour cela que dans notre projet de recherche la lumière rouge a été choisie. Cependant, Hatakeyama *et al.* ont montré sur des xénogreffes sous-cutanées induites par les cellules de CCR humain HT-29 une diminution significative du volume tumoral des tumeurs irradiées par la lumière bleue par rapport à la lumière rouge après traitement avec le 5-ALA (266). Il serait donc envisageable de comparer ces 2 types d'irradiation avec les TPPOH-X SNPs afin d'optimiser au maximum le protocole de PDT. L'une des alternatives possibles au problème de pénétration de la lumière dans les tissus afin d'activer les PS est de coupler la PDT avec la chimiothérapie. En effet, la chimiothérapie permettrait de détruire les cellules cancéreuses plus en profondeur de la tumeur là où les PS ne sont pas photoactivés. En revanche, il faut absolument que la chimiothérapie ne soit cytotoxique qu'au niveau de la tumeur sinon tous les bénéfices de la PDT par rapport à la chimiothérapie sur les effets secondaires seraient annulés. L'une des stratégies envisageables est d'encapsuler la chimiothérapie dans des MSNs et de décorer ensuite ces MSNs avec la TPPOH-X. Il a été démontré par Zhang *et al.* que les MSNs-PEGylées décorées de Ce6 et encapsulant le cisplatine montrent une efficacité anticancéreuse significativement supérieure par rapport aux MSNs sans cisplatine sur une lignée cellulaire de cancer du poumon humain A549 (267).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Bien sûr, le challenge majeur de cette technique est de maîtriser le relargage de la chimiothérapie, ce qui ne semble pas être totalement le cas dans cette étude du fait de la cytotoxicité des MSNs encapsulant le cisplatine à l'obscurité.

Notre projet de recherche a démontré l'efficacité anticancéreuse des TPPOH-X SNPs mais malheureusement ce traitement n'a ni éradiqué la tumeur ni même arrêté la croissance tumorale. En effet, le traitement avec les TPPOH-X SNPs photoactivées à la dose d'1/100ème de la LD_{50} a permis de diminuer d'environ 38% le volume tumoral par rapport à la même condition non photoactivée ou aux conditions témoins. Le multitraitement avec les TPPOH-X SNPs photoactivées a quant à lui permis d'améliorer l'efficacité anti-tumorale avec une diminution du volume tumoral d'environ 55%. Il faut noter que la dose d'1/100ème de la LD_{50} est une très faible dose et qu'une augmentation de cette dernière devrait probablement augmenter l'efficacité anticancéreuse des TPPOH-X SNPs. Néanmoins, même si la PDT se présente majoritairement comme une stratégie plutôt palliative en complément d'une chirurgie curative, la masse tumorale résiduelle après traitement reste importante mettant en lumière une possible résistance des cellules cancéreuses. Il a été démontré un rôle clé de l'hypoxie dans la résistance des tumeurs aux traitements anticancéreux (268). En effet, la croissance des cellules cancéreuses étant très rapide, la néovascularisation tumorale est importante afin d'apporter les éléments essentiels aux cellules en division. Cependant, cette néovascularisation se met en place de façon chaotique au sein de la tumeur créant un gradient de perfusion en O_2, ce qui entraîne l'hypoxie de certaines cellules cancéreuses. Puisque l'efficacité anticancéreuse de la PDT repose sur la génération d'ERO cellulaires, les cellules cancéreuses hypoxiques seront donc majoritairement résistantes à la PDT. Il existe néanmoins plusieurs stratégies permettant d'outrepasser l'hypoxie cellulaire afin d'améliorer l'efficacité des traitements par PDT (269–271). Une des stratégies envisageables est d'utiliser des NPs encapsulant des perfluorocarbones. En effet, ces perfluorocarbones permettent de transporter de grande quantité d'oxygène au contact des PS entraînant ainsi l'efficacité anticancéreuse de la PDT même dans des conditions hypoxiques. Il serait donc intéressant d'encapsuler des perfluorocarbones chargés en O_2 dans des MSNs recouvertes de TPPOH-X afin d'évaluer l'impact sur la croissance tumorale par rapport aux autres conditions de notre projet de recherche. Lu *et al.* ont montré l'intérêt de ces perfluorocarbones en encapsulant des perfluoropentanes chargés en O_2 dans des MSNs lors de traitement par radiothérapie (272). Grâce à leurs nanoobjets, ils ont démontré une quasi-suppression tumorale de xénogreffes sous-cutanées induites par les cellules humaines de glioblastome U87MG connues pour être des cellules très hypoxiques donc très résistantes. En revanche, la radiothérapie seule sur les mêmes tumeurs n'a entraîné qu'une diminution de 50% de la croissance tumorale. Une autre des stratégies envisageables est d'inhiber les facteurs inductibles de l'hypoxie comme HIF-1 (« Hypoxia-Inducible Factor-1 »), notamment la sous-unité α qui est dépendante du taux d'oxygène. En effet, HIF-1 est le régulateur central de l'expression de gènes qui permettent un basculement sur le métabolisme anaérobie et la production d'énergie (*via* la voie glycolytique) nécessaire aux cellules lorsque les apports en oxygène sont réduits (273). Kopecka *et al.* ont démontré que l'encapsulation de l'acide zolédronique dans des NPs permet d'inhiber l'expression d'HIF-1α conduisant à l'augmentation de l'efficacité anticancéreuse de molécules chimiothérapeutiques sur des cellules humaines de cancer du poumon A549 multi-résistantes (274).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

En effet, ces auteurs ont montré une diminution significative de la croissance tumorale de xénogreffes sous-cutanées induites par ces cellules multi-résistantes lors du co-traitement avec les NPs d'acide zolédronique et la doxorubicine ou le carboplatine en comparaison des molécules chimiothérapeutiques seules, qui du fait de la résistance des cellules cancéreuses, n'ont que très peu d'efficacité sur la croissance tumorale. L'inhibition de l'hypoxie tumorale semble donc être l'une des clés afin d'améliorer l'efficacité anticancéreuse des TPPOH-X SNPs. Dans des études pré-cliniques, l'hypoxie tumorale joue probablement un rôle important par rapport aux études en cliniques. En effet, les xénogreffes mises en place afin d'évaluer l'efficacité anticancéreuse de nouveaux traitements ont de nombreux avantages mais de par leur croissance extrêmement rapide (quelques jours) par rapport à plusieurs années chez un patient, la vascularisation tumorale est très anarchique favorisant l'hypoxie. Même si le modèle *in vivo* est forcément une avancée considérable afin d'étudier l'impact sur un organisme entier par rapport aux lignées cellulaires *in vitro*, le choix du bon modèle n'est pas toujours évident du fait de l'existence de nombreux modèles pré-cliniques pour le CCR avec des avantages et des inconvénients pour chaque modèle (275). Choisir le bon modèle est déterminant puisqu'une variété importante de nouveaux traitements anticancéreux montrent un intérêt conséquent dans des études pré-cliniques mais environ 5% sont testés en phase clinique de phase I et la majorité de ces 5% sont stoppés avant les études de phases II/III (276,277). Les xénogreffes sous-cutanées induites par des lignées cellulaires cancéreuses humaines permettent d'évaluer rapidement l'efficacité d'un traitement anticancéreux de par la facilité de mise en place du modèle et l'accessibilité simplifiée des tumeurs pour réaliser la PDT ainsi que le suivi de la croissance tumorale. Néanmoins, cette technique a le désavantage de manquer d'interaction entre l'hôte et la tumeur, notamment par l'utilisation de souris immunodéficientes qui ne permettent pas de mimer l'impact du système immunitaire dans le développement tumoral. Afin d'améliorer les interactions hôte et tumeur, il est envisageable de réaliser des xénogreffes orthotopiques directement au niveau du côlon. Cette technique a pour avantage de mieux mimer le microenvironnement tumoral, cependant ce dernier sera murin. Les xénogreffes de tumeurs de patients permettent elles de recréer un microenvironnement tumoral humain se rapprochant au plus proche des conditions retrouvées en clinique mais, au bout de seulement 3 semaines environ pour les tumeurs colorectales, l'hôte murin reprend le dessus sur la tumeur entraînant un microenvironnement tumoral murin. Malgré les avantages conséquents de ces différentes techniques, les xénogreffes entraînent une croissance tumorale extrêmement rapide par rapport à celle des patients générant de nombreuses discordances notamment dans la néovascularisation tumorale. Les modèles de souris génétiquement modifiées ou chimio-induits développant des CCR sont des modèles qui miment parfaitement les relations hôte/tumeur, le microenvironnement tumoral, le système immunitaire ainsi qu'une croissance tumorale plus proche de celle retrouvée en clinique. En revanche, les cellules cancéreuses restent des cellules murines donc il est difficile de transposer directement les traitements efficaces à l'homme. L'importance de tester les nouveaux traitements anticancéreux sur des modèles *in vivo* adaptés semble indispensable, il s'avèrerait donc très important de réaliser l'évaluation de l'efficacité anticancéreuse des TPPOH-X SNPs sur différents modèles de CCR afin de conclure sur le réel intérêt thérapeutique de ce nouveau traitement avant de potentielles futures investigations en phase clinique.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Références bibliographiques

1. Le cancer du côlon : points clés - Cancer du côlon, Institut national du cancer. https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/Points-cles (consulté le 7 août 2019).

2. Cancer today - Centre international de recherche sur le cancer. http://gco.iarc.fr/today/home (consulté le 7 août 2019).

3. Gospodarowicz MK, Wittekind C, Brierley D. TNM classification des tumeurs malignes. 8e ed. Union Internationale Contre le Cancer, CASSINI, 2019

4. Colon Cancer Treatment (PDQ®): Health Professional Version. PDQ Adult Treatment Editorial Board. Bethesda (MD): National Cancer Institute (US), 2002. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK65858/ (consulté le 7 août 2019).

5. Référentiel côlon OncoLogiK. http://oncologik.fr/referentiels/interregion/colon (consulté le 7 août 2019).

6. Matsuda T, Yamashita K, Hasegawa H, Oshikiri T, Hosono M, Higashino N, *et al.* Recent updates in the surgical treatment of colorectal cancer. Ann Gastroenterol Surg. 2018, 2(2): 129–36.

7. Wolpin BM, Mayer RJ. Systemic Treatment of Colorectal Cancer. Gastroenterology. 2008, 134(5): 1296–310.

8. Belliere A, Chapet O, Coquard R, Romestaing P, Ardiet JM, Gérard JP. [Brachytherapy in carcinomas of anal canal and rectum: techniques and results]. Cancer Radiother J Soc Francaise Radiother Oncol. 2003, 7(1): 24–32.

9. Sun Myint A, Smith FM, Gollins SW, Wong H, Rao C, Whitmarsh K, *et al.* Dose escalation using contact X-ray brachytherapy (Papillon) for rectal cancer: does it improve the chance of organ preservation? Br J Radiol. 2017, 90(1080): 20170175.

10. Lee YT, Tan YJ, Oon CE. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. Eur J Pharmacol. 2018, 834: 188–96.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

11. Verwaal VJ, van Ruth S, de Bree E, van Sloothen GW, van Tinteren H, Boot H, *et al.* Randomized trial of cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy and palliative surgery in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2003, 21(20): 3737–43.

12. Elias D, Lefevre JH, Chevalier J, Brouquet A, Marchal F, Classe J-M, *et al.* Complete cytoreductive surgery plus intraperitoneal chemohyperthermia with oxaliplatin for peritoneal carcinomatosis of colorectal origin. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2009, 27(5): 681–5.

13. Elias D, Bonnay M, Puizillou JM, Antoun S, Demirdjian S, El OA, *et al.* Heated intra-operative intraperitoneal oxaliplatin after complete resection of peritoneal carcinomatosis: pharmacokinetics and tissue distribution. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol. 2002, 13(2): 267–72.

14. Elias D, Goere D, Blot F, Billard V, Pocard M, Kohneh-Shahri N, *et al.* Optimization of hyperthermic intraperitoneal chemotherapy with oxaliplatin plus irinotecan at 43 degrees C after compete cytoreductive surgery: mortality and morbidity in 106 consecutive patients. Ann Surg Oncol. 2007, 14(6): 1818–24.

15. Dagois S, Grienay M, Pocard M, Gayat É, Lo Dico R, Marry L, *et al.* La chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale (CHIP) (podcast). Prat En Anesth Réanimation. 2015, 19(6): 308–14.

16. Kuchen N, Cereser T, Hailemariam S, Schoeb O. Safety and efficacy of pressurized intraperitoneal/intrathoracic aerosol chemotherapy (PIPAC/PITAC) in patients with peritoneal and/or pleural carcinomatosis: A preliminary experience. J Med Ther. 2018, 2(1): 1-6.

17. Van der Jeught K, Xu H-C, Li Y-J, Lu X-B, Ji G. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2018, 24(34): 3834–48.

18. Hamblin MR, Mroz P. Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical. 1 edition. Boston, Mass: Artech House Publishers: Norwood, MA, USA, 2008.

19. Kwiatkowski S, Knap B, Przystupski D, Saczko J, Kędzierska E, Knap-Czop K, *et al.* Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. Biomed Pharmacother. 2018, 106: 1098–107.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

20. Jichlinski P, Forrer M, Mizeret J, Glanzmann T, Braichotte D, Wagnières G, *et al.* Clinical evaluation of a method for detecting superficial surgical transitional cell carcinoma of the bladder by light-induced fluorescence of protoporphyrin IX following the topical application of 5-aminolevulinic acid: preliminary results. Lasers Surg Med. 1997, 20(4): 402–8.

21. Colditz MJ, Jeffree RL. Aminolevulinic acid (ALA)-protoporphyrin IX fluorescence guided tumour resection. Part 1: Clinical, radiological and pathological studies. J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas. 2012, 19(11): 1471–4.

22. Acerbi F, Broggi M, Eoli M, Anghileri E, Cavallo C, Boffano C, *et al.* Is fluorescein-guided technique able to help in resection of high-grade gliomas? Neurosurg Focus. 2014, 36(2): E5.

23. Manny TB, Pompeo AS, Hemal AK. Robotic partial adrenalectomy using indocyanine green dye with near-infrared imaging: the initial clinical experience. Urology. 2013, 82(3): 738–42.

24. Tummers QRJG, Verbeek FPR, Schaafsma BE, Boonstra MC, van der Vorst JR, Liefers G-J, *et al.* Real-time intraoperative detection of breast cancer using near-infrared fluorescence imaging and Methylene Blue. Eur J Surg Oncol J Eur Soc Surg Oncol Br Assoc Surg Oncol. 2014, 40(7): 850–8.

25. van der Vorst JR, Schaafsma BE, Verbeek FPR, Swijnenburg R-J, Tummers QRJG, Hutteman M, *et al.* Intraoperative near-infrared fluorescence imaging of parathyroid adenomas with use of low-dose methylene blue. Head Neck. 2014, 36(6): 853–8.

26. Aydogan F, Ozben V, Aytac E, Yilmaz H, Cercel A, Celik V. Excision of Nonpalpable Breast Cancer with Indocyanine Green Fluorescence-Guided Occult Lesion Localization (IFOLL). Breast Care Basel Switz. 2012, 7(1): 48–51.

27. Triesscheijn M, Baas P, Schellens JHM, Stewart FA. Photodynamic therapy in oncology. The Oncologist. 2006, 11(9): 1034–44.

28. Webber J, Kessel D, Fromm D. Side effects and photosensitization of human tissues after aminolevulinic acid. J Surg Res. 1997, 68(1): 31–7.

29. Dolmans DEJGJ, Fukumura D, Jain RK. Photodynamic therapy for cancer. Nat Rev Cancer. 2003, 3(5): 380–7.

30. DeRosa MC, Crutchley RJ. Photosensitized singlet oxygen and its applications. Coord Chem Rev. 2002, 233–234: 351–71.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

31. Foote CS. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. Photochem Photobiol. 1991, 54(5): 659.

32. Kulig MJ, Smith LL. Sterol metabolism. XXV. Cholesterol oxidation by singlet molecular oxygen. J Org Chem. 1973, 38(20): 3639–42.

33. Baptista M da S, Cadet J, Di Mascio P, Ghogare AA, Greer A, Hamblin MR, *et al.* Type I and II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. Photochem Photobiol. 2017, 93(4): 912–9.

34. Oleinick NL, Morris RL, Belichenko I. The role of apoptosis in response to photodynamic therapy: what, where, why, and how. Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol. 2002, 1(1): 1–21.

35. Redmond RW, Kochevar IE. Spatially resolved cellular responses to singlet oxygen. Photochem Photobiol. 2006, 82(5): 1178–86.

36. Bagdonas S, Ma LW, Iani V, Rotomskis R, Juzenas P, Moan J. Phototransformations of 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX *in vitro*: a spectroscopic study. Photochem Photobiol. 2000, 72(2): 186–92.

37. Spikes JD. Quantum yields and kinetics of the photobleaching of hematoporphyrin, Photofrin II, tetra(4-sulfonatophenyl)-porphine and uroporphyrin. Photochem Photobiol. 1992, 55(6): 797–808.

38. Abrahamse H, Hamblin MR. New photosensitizers for photodynamic therapy. Biochem J. 2016, 473(4): 347–64.

39. Agostinis P, Vantieghem A, Merlevede W, de Witte PAM. Hypericin in cancer treatment: more light on the way. Int J Biochem Cell Biol. 2002, 34(3): 221–41.

40. LM Davids KM. The Anticancer Activity of Hypericin in Photodynamic Therapy. J Bioanal Biomed. 2012, s6.

41. Gabrielli D, Belisle E, Severino D, Kowaltowski AJ, Baptista MS. Binding, aggregation and photochemical properties of methylene blue in mitochondrial suspensions. Photochem Photobiol. 2004, 79(3): 227–32.

42. Tardivo JP, Del Giglio A, de Oliveira CS, Gabrielli DS, Junqueira HC, Tada DB, *et al.* Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2005, 2(3): 175–91.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

43. Morrill JL, Diehl HS, Maloney WP, Gault N. University of Minnesota Medical Bulletin https://conservancy.umn.edu/bitstream/handle/11299/167339/Bulletin19551015.pdf?sequence=1&isAllowed=y (consulté le 14 août 2019).

44. Lipson RL, Baldes EJ, Olsen AM. The use of a derivative of hematoporhyrin in tumor detection. J Natl Cancer Inst. 1961, 26: 1–11.

45. Lipson RL, Baldes EJ, Gray MJ. Hematoporphyrin derivative for detection and management of cancer. Cancer. 1967, 20(12): 2255–7.

46. Dougherty TJ, Potter WR, Weishaupt KR. The structure of the active component of hematoporphyrin derivative. Prog Clin Biol Res. 1984, 170: 301–14.

47. Usuda J, Kato H, Okunaka T, Furukawa K, Tsutsui H, Yamada K, *et al.* Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers. J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer. 2006, 1(5): 489–93.

48. Nseyo UO, DeHaven J, Dougherty TJ, Potter WR, Merrill DL, Lundahl SL, *et al.* Photodynamic therapy (PDT) in the treatment of patients with resistant superficial bladder cancer: a long-term experience. J Clin Laser Med Surg. 1998, 16(1): 61–8.

49. Sutedja T, Baas P, Stewart F, van Zandwijk N. A pilot study of photodynamic therapy in patients with inoperable non-small cell lung cancer. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. 1992, 28A(8–9): 1370–3.

50. Nyman ES, Hynninen PH. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B. 2004, 73(1–2): 1–28.

51. Lou P-J, Jones L, Hopper C. Clinical outcomes of photodynamic therapy for head-and-neck cancer. Technol Cancer Res Treat. 2003, 2(4): 311–7.

52. Savary JF, Monnier P, Fontolliet C, Mizeret J, Wagnières G, Braichotte D, *et al.* Photodynamic therapy for early squamous cell carcinomas of the esophagus, bronchi, and mouth with m-tetra (hydroxyphenyl) chlorin. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1997, 123(2): 162–8.

53. Copper MP, Tan IB, Oppelaar H, Ruevekamp MC, Stewart FA. Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin photodynamic therapy in early-stage squamous cell carcinoma of the head and neck. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2003, 129(7): 709–11.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

54. Wyss P, Schwarz V, Dobler-Girdziunaite D, Hornung R, Walt H, Degen A, *et al.* Photodynamic therapy of locoregional breast cancer recurrences using a chlorin-type photosensitizer. Int J Cancer. 2001, 93(5): 720–4.

55. Bown SG, Rogowska AZ, Whitelaw DE, Lees WR, Lovat LB, Ripley P, *et al.* Photodynamic therapy for cancer of the pancreas. Gut. 2002, 50(4): 549–57.

56. Nathan TR, Whitelaw DE, Chang SC, Lees WR, Ripley PM, Payne H, *et al.* Photodynamic therapy for prostate cancer recurrence after radiotherapy: a phase I study. J Urol. 2002, 168(4 Pt 1): 1427–32.

57. Renschler MF, Yuen AR, Panella TJ, M.d TJW, Dougherty S, Esserman L, *et al.* Photodynamic therapy trials with lutetium texaphyrin (Lu-Tex) in patients with locally recurrent breast cancer. Proceedings Volume 3247, Optical Methods for Tumor Treatment and Detections: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy VII. 1998.

58. Patel H, Mick R, Finlay J, Zhu TC, Rickter E, Cengel KA, *et al.* Motexafin lutetium-photodynamic therapy of prostate cancer: short- and long-term effects on prostate-specific antigen. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2008, 14(15): 4869–76.

59. Rodriguez-Rivera JA, Rodriguez-Lay R, Zegarra-Montes L, Benzaghou F, Gaillac B, Azzouzi AR, *et al.* Expanding indication of padeliporfin (WST11) vascular-targeted photodynamic therapy: results of prostate cancer Latin-American multicenter study. Actas Urol Esp. 2018, 42(10): 632–8.

60. Azzouzi A-R, Vincendeau S, Barret E, Cicco A, Kleinclauss F, van der Poel HG, *et al.* Padeliporfin vascular-targeted photodynamic therapy versus active surveillance in men with low-risk prostate cancer (CLIN1001 PCM301): an open-label, phase 3, randomised controlled trial. Lancet Oncol. 2017, 18(2): 181–91.

61. Kato H, Furukawa K, Sato M, Okunaka T, Kusunoki Y, Kawahara M, *et al.* Phase II clinical study of photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 and diode laser for early superficial squamous cell carcinoma of the lung. Lung Cancer Amst Neth. 2003, 42(1): 103–11.

62. Yano T, Kasai H, Horimatsu T, Yoshimura K, Teramukai S, Morita S, *et al.* A multicenter phase II study of salvage photodynamic therapy using talaporfin sodium (ME2906) and a diode laser (PNL6405EPG) for local failure after chemoradiotherapy or radiotherapy for esophageal cancer. Oncotarget. 2017, 8(13): 22135–44.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

63. Kujundzić M, Vogl TJ, Stimac D, Rustemović N, Hsi RA, Roh M, *et al.* A Phase II safety and effect on time to tumor progression study of intratumoral light infusion technology using talaporfin sodium in patients with metastatic colorectal cancer. J Surg Oncol. 2007, 96(6): 518–24.

64. Wachowska M, Muchowicz A, Firczuk M, Gabrysiak M, Winiarska M, Wańczyk M, *et al.* Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer. Molecules. 2011, 16(5): 4140–64.

65. Ohgari Y, Nakayasu Y, Kitajima S, Sawamoto M, Mori H, Shimokawa O, *et al.* Mechanisms involved in delta-aminolevulinic acid (ALA)-induced photosensitivity of tumor cells: relation of ferrochelatase and uptake of ALA to the accumulation of protoporphyrin. Biochem Pharmacol. 2005, 71(1–2): 42–9.

66. Stout DL, Becker FF. Heme synthesis in normal mouse liver and mouse liver tumors. Cancer Res. 1990, 50(8): 2337–40.

67. Kurwa HA, Yong-Gee SA, Seed PT, Markey AC, Barlow RJ. A randomized paired comparison of photodynamic therapy and topical 5-fluorouracil in the treatment of actinic keratoses. J Am Acad Dermatol. 1999, 41(3 Pt 1): 414–8.

68. Swamy N, James DA, Mohr SC, Hanson RN, Ray R. An estradiol-porphyrin conjugate selectively localizes into estrogen receptor-positive breast cancer cells. Bioorg Med Chem. 2002, 10(10): 3237–43.

69. Parker N, Turk MJ, Westrick E, Lewis JD, Low PS, Leamon CP. Folate receptor expression in carcinomas and normal tissues determined by a quantitative radioligand binding assay. Anal Biochem. 2005, 338(2): 284–93.

70. Schneider R, Schmitt F, Frochot C, Fort Y, Lourette N, Guillemin F, *et al.* 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.

71. Holley JL, Mather A, Wheelhouse RT, Cullis PM, Hartley JA, Bingham JP, *et al.* Targeting of tumor cells and DNA by a chlorambucil-spermidine conjugate. Cancer Res. 1992, 52(15): 4190–5.

72. Fidanzi-Dugas C, Liagre B, Chemin G, Perraud A, Carrion C, Couquet C-Y, *et al.* Analysis of the *in vitro* and *in vivo* effects of Photodynamic Therapy on Prostate Cancer by using new photosensitizers, protoporphyrin IX-polyamine derivatives. Biochim Biophys Acta. 2017, 1861(7): 1676-1690.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

73. Lupu M, Maillard P, Mispelter J, Poyer F, Thomas CD. A glycoporphyrin story: from chemistry to PDT treatment of cancer mouse models. Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol. 2018, 17(11): 1599–611.

74. Conway CL, Walker I, Bell A, Roberts DJH, Brown SB, Vernon DI. *In vivo* and *in vitro* characterisation of a protoporphyrin IX-cyclic RGD peptide conjugate for use in photodynamic therapy. Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol. 2008, 7(3): 290–8.

75. Nagaya T, Sato K, Harada T, Nakamura Y, Choyke PL, Kobayashi H. Near Infrared Photoimmunotherapy Targeting EGFR Positive Triple Negative Breast Cancer: Optimizing the Conjugate-Light Regimen. PloS One. 2015, 10(8): e0136829.

76. Kim KS, Kim J, Kim DH, Hwang HS, Na K. Multifunctional trastuzumab-chlorin e6 conjugate for the treatment of HER2-positive human breast cancer. Biomater Sci. 2018, 6(5): 1217–26.

77. Herrera-Ornelas L, Petrelli NJ, Mittelman A, Dougherty TJ, Boyle DG. Photodynamic therapy in patients with colorectal cancer. Cancer. 1986, 57(3): 677–84.

78. Patrice T, Foultier MT, Yactayo S, Adam F, Galmiche JP, Douet MC, *et al.* Endoscopic photodynamic therapy with hematoporphyrin derivative for primary treatment of gastrointestinal neoplasms in inoperable patients. Dig Dis Sci. 1990, 35(5): 545–52.

79. Krasner N. Laser therapy in the management of benign and malignant tumours in the colon and rectum. Int J Colorectal Dis. 1989, 4(1): 2–5.

80. Kashtan H, Papa MZ, Wilson BC, Deutch AA, Stern HS. Use of photodynamic therapy in the palliation of massive advanced rectal cancer. Phase I/II study. Dis Colon Rectum. 1991, 34(7): 600–4; discussion 604-605.

81. A Study of Neoadjuvant Photodynamic Immunomodulation for Colon Cancer. Identifier: NCT01522677. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01522677 (consulté le 8 août 2019).

82. Loh CS, Bliss P, Bown SG, Krasner N. Photodynamic therapy for villous adenomas of the colon and rectum. Endoscopy. 1994, 26(2): 243–6.

83. Loh CS, MacRobert AJ, Bedwell J, Regula J, Krasner N, Bown SG. Oral versus intravenous administration of 5-aminolaevulinic acid for photodynamic therapy. Br J Cancer. 1993, 68(1): 41–51.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

84. Mlkvy P, Messmann H, Debinski H, Regula J, Conio M, MacRobert A, *et al.* Photodynamic therapy for polyps in familial adenomatous polyposis--a pilot study. Eur J Cancer Oxf Engl 1990. 1995, 31A(7–8): 1160–5.

85. MÍkvy P, Messmann H, Regula J, Conio M, Pauer M, Millson CE, *et al.* Photodynamic therapy for gastrointestinal tumors using three photosensitizers--ALA induced PPIX, Photofrin and MTHPC. A pilot study. Neoplasma. 1998, 45(3): 157–61.

86. Taber SW, Fingar VH, Coots CT, Wieman TJ. Photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 (Npe6) for the treatment of cutaneous disease: a Phase I clinical study. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 1998, 4(11): 2741–6.

87. Lustig RA, Vogl TJ, Fromm D, Cuenca R, Alex Hsi R, D'Cruz AK, *et al.* A multicenter Phase I safety study of intratumoral photoactivation of talaporfin sodium in patients with refractory solid tumors. Cancer. 2003, 98(8): 1767–71.

88. Photodynamic Therapy System for Patients With Refractory/Unresponsive Solid Tumors. Identifier: NCT00028405. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00028405 (consulté le 8 août 2019).

89. van Duijnhoven FH, Rovers JP, Engelmann K, Krajina Z, Purkiss SF, Zoetmulder FAN, *et al.* Photodynamic therapy with 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl) bacteriochlorin for colorectal liver metastases is safe and feasible: results from a phase I study. Ann Surg Oncol. 2005, 12(10): 808–16.

90. Safety and Efficiency of Photodynamic Therapy for Rectal Cancer (PDT-R-01). Identifier: NCT01872104. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01872104 (consulté le 8 août 2019).

91. Allison RR, Sheng C, Cuenca R, Bagnato VS, Austerlitz C, Sibata CH. Photodynamic therapy for anal cancer. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2010, 7(2): 115–9.

92. Hahn SM, Putt ME, Metz J, Shin DB, Rickter E, Menon C, *et al.* Photofrin uptake in the tumor and normal tissues of patients receiving intraperitoneal photodynamic therapy. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2006, 12(18): 5464–70.

93. Kawczyk-Krupka A, Bugaj AM, Latos W, Zaremba K, Wawrzyniec K, Kucharzewski M, *et al.* Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment--The state of the art in preclinical research. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2016, 13: 158–74.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

94. Kawczyk-Krupka A, Bugaj AM, Latos W, Zaremba K, Wawrzyniec K, Sieroń A. Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment: the state of the art in clinical trials. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2015, 12(3): 545–53.

95. Strebhardt K, Ullrich A. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. Nat Rev Cancer. 2008, 8(6): 473–80.

96. Kreuter J. Nanoparticles--a historical perspective. Int J Pharm. 2007, 331(1): 1–10.

97. Bonvalot S, Rutkowski PL, Thariat J, Carrère S, Ducassou A, Sunyach M-P, *et al.* NBTXR3, a first-in-class radioenhancer hafnium oxide nanoparticle, plus radiotherapy versus radiotherapy alone in patients with locally advanced soft-tissue sarcoma (Act.In.Sarc): a multicentre, phase 2-3, randomised, controlled trial. Lancet Oncol. 2019, 20(8): 1148–59.

98. Vines JB, Yoon J-H, Ryu N-E, Lim D-J, Park H. Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy. Front Chem. 2019, 7: 167.

99. Khot MI, Andrew H, Svavarsdottir HS, Armstrong G, Quyn AJ, Jayne DG. A Review on the Scope of Photothermal Therapy-Based Nanomedicines in Preclinical Models of Colorectal Cancer. Clin Colorectal Cancer. 2019, 18(2): e200–9.

100. Bertrand N, Wu J, Xu X, Kamaly N, Farokhzad OC. Cancer nanotechnology: the impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology. Adv Drug Deliv Rev. 2014, 66: 2–25.

101. Duncan R, Gaspar R. Nanomedicine(s) under the microscope. Mol Pharm. 2011, 8(6): 2101–41.

102. Hashizume H, Baluk P, Morikawa S, McLean JW, Thurston G, Roberge S, *et al.* Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. Am J Pathol. 2000, 156(4): 1363–80.

103. Padera TP, Stoll BR, Tooredman JB, Capen D, di Tomaso E, Jain RK. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels. Nature. 2004, 427(6976): 695.

104. Kobayashi H, Watanabe R, Choyke PL. Improving conventional enhanced permeability and retention (EPR) effects; what is the appropriate target? Theranostics. 2013, 4(1): 81–9.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

105. Matsumura Y, Maeda H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. Cancer Res. 1986, 46(12 Pt 1): 6387–92.

106. Iyer AK, Khaled G, Fang J, Maeda H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. Drug Discov Today. 2006, 11(17): 812–8.

107. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. Nat Nanotechnol. 2007, 2(12): 751–60.

108. Bangham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. J Mol Biol. 1964, 8(5): 660-IN10.

109. Steichen SD, Caldorera-Moore M, Peppas NA. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics. Eur J Pharm Sci Off J Eur Fed Pharm Sci. 2013, 48(3): 416–27.

110. Koo OM, Rubinstein I, Onyuksel H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. 2005, 1(3): 193–212.

111. Couvreur P, Kante B, Roland M, Speiser P. Adsorption of Antineoplastic Drugs to Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles and Their Release in Calf Serum. J Pharm Sci. 1979, 68(12): 1521–4.

112. Couvreur P, Kante B, Grislain L, Roland M, Speiser P. Toxicity of Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles II: Doxorubicin-Loaded Nanoparticles. J Pharm Sci. 1982, 71(7): 790–2.

113. Mura S, Fattal E, Nicolas J. From poly(alkyl cyanoacrylate) to squalene as core material for the design of nanomedicines. J Drug Target. 2019, 27(5–6): 470–501.

114. Gryparis EC, Hatziapostolou M, Papadimitriou E, Avgoustakis K. Anticancer activity of cisplatin-loaded PLGA-mPEG nanoparticles on LNCaP prostate cancer cells. Eur J Pharm Biopharm Off J Arbeitsgemeinschaft Pharm Verfahrenstechnik EV. 2007, 67(1): 1–8.

115. Caminade A-M, Turrin C-O. Dendrimers for drug delivery. J Mater Chem B. 2014, 2(26): 4055–66.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

116. He P, Davis SS, Illum L. *In vitro* evaluation of the mucoadhesive properties of chitosan microspheres. Int J Pharm. 1998, 166(1): 75–88.

117. Mitra S, Gaur U, Ghosh PC, Maitra AN. Tumour targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. J Control Release Off J Control Release Soc. 2001, 74(1–3): 317–23.

118. Maeng JH, Lee D-H, Jung KH, Bae Y-H, Park I-S, Jeong S, *et al.* Multifunctional doxorubicin loaded superparamagnetic iron oxide nanoparticles for chemotherapy and magnetic resonance imaging in liver cancer. Biomaterials. 2010, 31(18): 4995–5006.

119. Dadfar SM, Roemhild K, Drude NI, von Stillfried S, Knüchel R, Kiessling F, *et al.* Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. Adv Drug Deliv Rev. 2019, 138: 302–25.

120. Martinelli C, Pucci C, Ciofani G. Nanostructured carriers as innovative tools for cancer diagnosis and therapy. APL Bioeng. 2019, 3(1): 011502.

121. Mahmoudi K, Bouras A, Bozec D, Ivkov R, Hadjipanayis C. Magnetic hyperthermia therapy for the treatment of glioblastoma: a review of the therapy's history, efficacy and application in humans. Int J Hyperth Off J Eur Soc Hyperthermic Oncol North Am Hyperth Group. 2018, 34(8): 1316–28.

122. Black KCL, Wang Y, Luehmann HP, Cai X, Xing W, Pang B, *et al.* Radioactive 198Au-doped nanostructures with different shapes for *in vivo* analyses of their biodistribution, tumor uptake, and intratumoral distribution. ACS Nano. 2014, 8(5): 4385–94.

123. Guo J, Rahme K, He Y, Li L-L, Holmes JD, O'Driscoll CM. Gold nanoparticles enlighten the future of cancer theranostics. Int J Nanomedicine. 2017, 12: 6131–52.

124. Chen R, Wang X, Yao X, Zheng X, Wang J, Jiang X. Near-IR-triggered photothermal/photodynamic dual-modality therapy system via chitosan hybrid nanospheres. Biomaterials. 2013, 34(33): 8314–22.

125. Chen Y, Gao Y, Chen H, Zeng D, Li Y, Zheng Y, *et al.* Engineering Inorganic Nanoemulsions/Nanoliposomes by Fluoride-Silica Chemistry for Efficient Delivery/Co-Delivery of Hydrophobic Agents. Adv Funct Mater. 2012, 22(8): 1586–97.

126. Huang L, Ma J, Wang X, Zhang P, Yu L, Zhang S. Mesoporous silica nanoparticles-loaded methyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) propanoate as a smart antioxidant of synthetic ester oil. Tribol Int. 2018, 121: 114–20.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

127. Silica-coated Gold Nanoparticles: Surface Chemistry, Properties, Benefits and Applications. https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/materials-science/silica-coated-gold-nanoparticles.html (consulté le 10 août 2019).

128. Vallet-Regi M, Rámila A, del Real RP, Pérez-Pariente J. A New Property of MCM-41: Drug Delivery System. Chem Mater. 2001, 13(2): 308–11.

129. Wu X, Wu M, Xiaojun Zhao J. Recent Development of Silica Nanoparticles as Delivery Vectors for Cancer Imaging and Therapy. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. 2014, 10(2): 297–312.

130. Yang Y, Yu C. Advances in silica based nanoparticles for targeted cancer therapy. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. 2016, 12(2): 317–32.

131. Hong S ho, Choi Y. Mesoporous silica-based nanoplatforms for the delivery of photodynamic therapy agents. J Pharm Investig. 2018, 48(1): 3–17.

132. Lu J, Liong M, Li Z, Zink JI, Tamanoi F. Biocompatibility, Biodistribution, and Drug-Delivery Efficiency of Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy in Animals. Small. 2010, 6(16): 1794–805.

133. Roy I, Ohulchanskyy TY, Pudavar HE, Bergey EJ, Oseroff AR, Morgan J, *et al.* Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy. J Am Chem Soc. 2003, 125(26): 7860–5.

134. He X, Wu X, Wang K, Shi B, Hai L. Methylene blue-encapsulated phosphonate-terminated silica nanoparticles for simultaneous *in vivo* imaging and photodynamic therapy. Biomaterials. 2009, 30(29): 5601–9.

135. Gary-Bobo M, Hocine O, Brevet D, Maynadier M, Raehm L, Richeter S, *et al.* Cancer therapy improvement with mesoporous silica nanoparticles combining targeting, drug delivery and PDT. Int J Pharm. 2012, 423(2): 509–15.

136. Chiannilkulchai N, Ammoury N, Caillou B, Devissaguet JP, Couvreur P. Hepatic tissue distribution of doxorubicin-loaded nanoparticles after i.v. administration in reticulosarcoma M 5076 metastasis-bearing mice. Cancer Chemother Pharmacol. 1990, 26(2): 122–6.

137. Barraud L, Merle P, Soma E, Lefrançois L, Guerret S, Chevallier M, *et al.* Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. J Hepatol. 2005, 42(5): 736–43.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

138. Moghimi SM, Hunter AC, Murray JC. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. Pharmacol Rev. 2001, 53(2): 283–318.

139. Moghimi SM, Szebeni J. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties. Prog Lipid Res. 2003, 42(6): 463–78.

140. Gabizon AA. Stealth liposomes and tumor targeting: one step further in the quest for the magic bullet. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2001, 7(2): 223–5.

141. Ishida T, Maeda R, Ichihara M, Irimura K, Kiwada H. Accelerated clearance of PEGylated liposomes in rats after repeated injections. J Control Release Off J Control Release Soc. 2003, 88(1): 35–42.

142. Abu Lila AS, Kiwada H, Ishida T. The accelerated blood clearance (ABC) phenomenon: clinical challenge and approaches to manage. J Control Release Off J Control Release Soc. 2013, 172(1): 38–47.

143. Shrotri A, Kobayashi H, Fukuoka A. Chapter Two-Catalytic Conversion of Structural Carbohydrates and Lignin to Chemicals. Adv. Catal. 2017, 60: 59–123.

144. Ma J, Li D, Zhong L, Du F, Tan J, Yang J, *et al.* Synthesis and characterization of biofunctional quaternized xylan-Fe2O3 core/shell nanocomposites and modification with polylysine and folic acid. Carbohydr Polym. 2018, 199: 382–9.

145. Daus S, Heinze T. Xylan-based nanoparticles: prodrugs for ibuprofen release. Macromol Biosci. 2010, 10(2): 211–20.

146. Sauraj, Kumar V, Kumar B, Deeba F, Bano S, Kulshreshtha A, *et al.* Lipophilic 5-fluorouracil prodrug encapsulated xylan-stearic acid conjugates nanoparticles for colon cancer therapy. Int J Biol Macromol. 2019, 128: 204–13.

147. Sauraj, Kumar SU, Kumar V, Priyadarshi R, Gopinath P, Negi YS. pH-responsive prodrug nanoparticles based on xylan-curcumin conjugate for the efficient delivery of curcumin in cancer therapy. Carbohydr Polym. 2018, 188: 252–9.

148. McNeeley KM, Karathanasis E, Annapragada AV, Bellamkonda RV. Masking and triggered unmasking of targeting ligands on nanocarriers to improve drug delivery to brain tumors. Biomaterials. 2009, 30(23–24): 3986–95.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

149. Stella B, Arpicco S, Peracchia MT, Desmaële D, Hoebeke J, Renoir M, *et al.* Design of folic acid-conjugated nanoparticles for drug targeting. J Pharm Sci. 2000, 89(11): 1452–64.

150. Schroeder JE, Shweky I, Shmeeda H, Banin U, Gabizon A. Folate-mediated tumor cell uptake of quantum dots entrapped in lipid nanoparticles. J Control Release Off J Control Release Soc. 2007, 124(1–2): 28–34.

151. van der Meel R, Vehmeijer LJC, Kok RJ, Storm G, van Gaal EVB. Ligand-targeted particulate nanomedicines undergoing clinical evaluation: current status. Adv Drug Deliv Rev. 2013, 65(10): 1284–98.

152. Shi J, Kantoff PW, Wooster R, Farokhzad OC. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. Nat Rev Cancer. 2017, 17(1): 20–37.

153. Ventola CL. Progress in Nanomedicine: Approved and Investigational Nanodrugs. Pharm Ther. 2017, 42(12): 742–55.

154. Phase II Study of Combined Temozolomide and SGT-53 for Treatment of Recurrent Glioblastoma. Identifier: NCT02340156. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02340156 (consulté le 12 août 2019).

155. Study of PNT2258 for Treatment of Relapsed or Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma. Identifier: NCT01733238. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01733238 (consulté le 12 août 2019).

156. MM-302 Plus Trastuzumab vs. Chemotherapy of Physician's Choice Plus Trastuzumab in HER2-Positive Locally Advanced/Metastatic Breast Cancer Patients (HERMIONE). Identifier: NCT02213744. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02213744 (consulté le 12 août 2019).

157. Multicenter Study Of CPX-1 (Irinotecan HCl: Floxuridine) Liposome Injection In Patients With Advanced Colorectal Cancer. Identifier: NCT00361842. https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00361842 (consulté le 12 août 2019).

158. Nawalany K, Rusin A, Kepczyński M, Mikhailov A, Kramer-Marek G, Snietura M, *et al.* Comparison of photodynamic efficacy of tetraarylporphyrin pegylated or encapsulated in liposomes: *in vitro* studies. J Photochem Photobiol B. 2009, 97(1): 8–17.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

159. Simon V, Devaux C, Darmon A, Donnet T, Thiénot E, Germain M, *et al.* Pp IX silica nanoparticles demonstrate differential interactions with *in vitro* tumor cell lines and *in vivo* mouse models of human cancers. Photochem Photobiol. 2010, 86(1): 213–22.

160. Bourdon O, Laville I, Carrez D, Croisy A, Fedel P, Kasselouri A, *et al.* Biodistribution of meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin incorporated into surface-modified nanocapsules in tumor-bearing mice. Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol. 2002, 1(9): 709–14.

161. Lee SJ, Koo H, Jeong H, Huh MS, Choi Y, Jeong SY, *et al.* Comparative study of photosensitizer loaded and conjugated glycol chitosan nanoparticles for cancer therapy. J Control Release Off J Control Release Soc. 2011, 152(1): 21–9.

162. Obaid G, Chambrier I, Cook MJ, Russell DA. Cancer targeting with biomolecules: a comparative study of photodynamic therapy efficacy using antibody or lectin conjugated phthalocyanine-PEG gold nanoparticles. Photochem Photobiol Sci Off J Eur Photochem Assoc Eur Soc Photobiol. 2015, 14(4): 737–47.

163. Abdelghany SM, Schmid D, Deacon J, Jaworski J, Fay F, McLaughlin KM, *et al.* Enhanced antitumor activity of the photosensitizer meso-Tetra(N-methyl-4-pyridyl) porphine tetra tosylate through encapsulation in antibody-targeted chitosan/alginate nanoparticles. Biomacromolecules. 2013, 14(2): 302–10.

164. He C, Duan X, Guo N, Chan C, Poon C, Weichselbaum RR, *et al.* Core-shell nanoscale coordination polymers combine chemotherapy and photodynamic therapy to potentiate checkpoint blockade cancer immunotherapy. Nat Commun. 2016, 7: 12499.

165. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972, 26(4): 239–57.

166. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. Toxicol Pathol. 2007, 35(4): 495–516.

167. Conradt B. Genetic control of programmed cell death during animal development. Annu Rev Genet. 2009, 43: 493–523.

168. Massé J, Watrin T, Laurent A, Deschamps S, Guerrier D, Pellerin I. The developing female genital tract: from genetics to epigenetics. Int J Dev Biol. 2009, 53(2–3): 411–24.

169. Fuchs Y, Steller H. Programmed cell death in animal development and disease. Cell. 2011, 147(4): 742–58.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

170. Denecker G, Hoste E, Gilbert B, Hochepied T, Ovaere P, Lippens S, *et al.* Caspase-14 protects against epidermal UVB photodamage and water loss. Nat Cell Biol. 2007, 9(6): 666–74.

171. Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of caspases. Cell Death Differ. 2015, 22(4): 526–39.

172. Couzinet A, Hérincs Z, Hueber A-O. Régulation de la mort cellulaire programmée : vers une conception plus dynamique. médecine/sciences. 2002, 18(8–9): 841–52.

173. Julien O, Wells JA. Caspases and their substrates. Cell Death Differ. 2017, 24(8): 1380–9.

174. Nakatani Y, Kleffmann T, Linke K, Condon SM, Hinds MG, Day CL. Regulation of ubiquitin transfer by XIAP, a dimeric RING E3 ligase. Biochem J. 2013, 450(3): 629–38.

175. Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, Decaudin D, Macho A, Hirsch T, *et al.* Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. J Exp Med. 1995, 182(2): 367–77.

176. Giménez-Cassina A, Danial NN. Regulation of mitochondrial nutrient and energy metabolism by BCL-2 family proteins. Trends Endocrinol Metab TEM. 2015, 26(4): 165–75.

177. Shibue T, Taniguchi T. BH3-only proteins: integrated control point of apoptosis. Int J Cancer. 2006, 119(9): 2036–43.

178. Antignani A, Youle RJ. How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? Curr Opin Cell Biol. 2006, 18(6): 685–9.

179. Marzo I, Brenner C, Zamzami N, Susin SA, Beutner G, Brdiczka D, *et al.* The permeability transition pore complex: a target for apoptosis regulation by caspases and bcl-2-related proteins. J Exp Med. 1998, 187(8): 1261–71.

180. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. Nat Rev Mol Cell Biol. 2001, 2(1): 67–71.

181. McCommis KS, Baines CP. The Role of VDAC in Cell Death: Friend or Foe? Biochim Biophys Acta. 2012, 1818(6): 1444–50.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

182. Riedl SJ, Salvesen GS. The apoptosome: signalling platform of cell death. Nat Rev Mol Cell Biol. 2007, 8(5): 405–13.

183. Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, *et al.* Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. FEBS Lett. 2000, 476(3): 118–23.

184. Li LY, Luo X, Wang X. Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. Nature. 2001, 412(6842): 95–9.

185. Plaetzer K, Kiesslich T, Verwanger T, Krammer B. The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. Med Laser Appl. 2003, 18(1): 7–19.

186. Mroz P, Yaroslavsky A, Kharkwal GB, Hamblin MR. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. Cancers. 2011, 3(2): 2516–39.

187. Furre IE, Shahzidi S, Luksiene Z, Møller MTN, Borgen E, Morgan J, *et al.* Targeting PBR by hexaminolevulinate-mediated photodynamic therapy induces apoptosis through translocation of apoptosis-inducing factor in human leukemia cells. Cancer Res. 2005, 65(23): 11051–60.

188. Lam M, Oleinick NL, Nieminen AL. Photodynamic therapy-induced apoptosis in epidermoid carcinoma cells. Reactive oxygen species and mitochondrial inner membrane permeabilization. J Biol Chem. 2001, 276(50): 47379–86.

189. Vantieghem A, Xu Y, Declercq W, Vandenabeele P, Denecker G, Vandenheede JR, *et al.* Different pathways mediate cytochrome c release after photodynamic therapy with hypericin. Photochem Photobiol. 2001, 74(2): 133–42.

190. Teiten M-H, Marchal S, D'Hallewin MA, Guillemin F, Bezdetnaya L. Primary photodamage sites and mitochondrial events after Foscan photosensitization of MCF-7 human breast cancer cells. Photochem Photobiol. 2003, 78(1): 9–14.

191. Chiu S-M, Xue L-Y, Usuda J, Azizuddin K, Oleinick NL. Bax is essential for mitochondrion-mediated apoptosis but not for cell death caused by photodynamic therapy. Br J Cancer. 2003, 89(8): 1590–7.

192. Ferenc P, Solár P, Kleban J, Mikes J, Fedorocko P. Down-regulation of Bcl-2 and Akt induced by combination of photoactivated hypericin and genistein in human breast cancer cells. J Photochem Photobiol B. 2010, 98(1): 25–34.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

193. Koval J, Mikes J, Jendzelovský R, Kello M, Solár P, Fedorocko P. Degradation of HER2 receptor through hypericin-mediated photodynamic therapy. Photochem Photobiol. 2010, 86(1): 200–5.

194. Xue LY, Chiu SM, Oleinick NL. Photochemical destruction of the Bcl-2 oncoprotein during photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4. Oncogene. 2001, 20(26): 3420–7.

195. Li W, Li J, Bao J. Microautophagy: lesser-known self-eating. Cell Mol Life Sci CMLS. 2012, 69(7): 1125–36.

196. Majeski AE, Dice JF. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. Int J Biochem Cell Biol. 2004, 36(12): 2435–44.

197. Fujiwara Y, Kikuchi H, Aizawa S, Furuta A, Hatanaka Y, Konya C, *et al.* Direct uptake and degradation of DNA by lysosomes. Autophagy. 2013, 9(8): 1167–71.

198. Fujiwara Y, Furuta A, Kikuchi H, Aizawa S, Hatanaka Y, Konya C, *et al.* Discovery of a novel type of autophagy targeting RNA. Autophagy. 2013, 9(3): 403–9.

199. Mizushima N. A brief history of autophagy from cell biology to physiology and disease. Nat Cell Biol. 2018, 20(5): 521–7.

200. Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. Curr Biol CB. 2012, 22(1): R29-34.

201. Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi Y. The role of Atg proteins in autophagosome formation. Annu Rev Cell Dev Biol. 2011, 27: 107–32.

202. Fu Y, Huang Z, Hong L, Lu J-H, Feng D, Yin X-M, *et al.* Targeting ATG4 in Cancer Therapy. Cancers (Basel). 2019, 11(5): 649.

203. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). Autophagy. 2016, 12(1): 1–222.

204. Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells. Cell Struct Funct. 2002, 27(6): 421–9.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

205. Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, *et al.* The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. J Biol Chem. 2007, 282(52): 37298–302.

206. Yu Z-Q, Ni T, Hong B, Wang H-Y, Jiang F-J, Zou S, *et al.* Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. Autophagy. 2012, 8(6): 883–92.

207. Abounit K, Scarabelli TM, McCauley RB. Autophagy in mammalian cells. World J Biol Chem. 2012, 3(1): 1–6.

208. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell. 2008, 132(1): 27–42.

209. Terman A, Gustafsson B, Brunk UT. Autophagy, organelles and ageing. J Pathol. 2007, 211(2): 134–43.

210. Singh SS, Vats S, Chia AY-Q, Tan TZ, Deng S, Ong MS, *et al.* Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. Oncogene. 2018, 37(9): 1142–58.

211. Mathew R, White E. Why sick cells produce tumors: the protective role of autophagy. Autophagy. 2007, 3(5): 502–5.

212. Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, *et al.* Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. Genes Dev. 2011, 25(8): 795–800.

213. Xie R, Wang F, McKeehan WL, Liu L. Autophagy enhanced by microtubule- and mitochondrion-associated MAP1S suppresses genome instability and hepatocarcinogenesis. Cancer Res. 2011, 71(24): 7537–46.

214. Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. Nat Rev Cancer. 2007, 7(12): 961–7.

215. Liu EY, Ryan KM. Autophagy and cancer--issues we need to digest. J Cell Sci. 2012, 125(Pt 10): 2349–58.

216. Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Takeuchi T, Kuwano H. Inhibition of autophagy by 3-MA enhances the effect of 5-FU-induced apoptosis in colon cancer cells. Ann Surg Oncol. 2009, 16(3): 761–71.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

217. Guo JY, Karsli-Uzunbas G, Mathew R, Aisner SC, Kamphorst JJ, Strohecker AM, *et al.* Autophagy suppresses progression of K-ras-induced lung tumors to oncocytomas and maintains lipid homeostasis. Genes Dev. 2013, 27(13): 1447–61.

218. Wei H, Wei S, Gan B, Peng X, Zou W, Guan J-L. Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis. Genes Dev. 2011, 25(14): 1510–27.

219. Lazova R, Klump V, Pawelek J. Autophagy in cutaneous malignant melanoma. J Cutan Pathol. 2010, 37(2): 256–68.

220. Galavotti S, Bartesaghi S, Faccenda D, Shaked-Rabi M, Sanzone S, McEvoy A, *et al.* The autophagy-associated factors DRAM1 and p62 regulate cell migration and invasion in glioblastoma stem cells. Oncogene. 2013, 32(6): 699–712.

221. Mowers EE, Sharifi MN, Macleod KF. Autophagy in cancer metastasis. Oncogene. 2017, 36(12): 1619–30.

222. Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Levine B, Green DR, Kroemer G. Pharmacological modulation of autophagy: therapeutic potential and persisting obstacles. Nat Rev Drug Discov. 2017, 16(7): 487–511.

223. Reiners JJ, Agostinis P, Berg K, Oleinick NL, Kessel D. Assessing autophagy in the context of photodynamic therapy. Autophagy. 2010, 6(1): 7–18.

224. Scherz-Shouval R, Shvets E, Fass E, Shorer H, Gil L, Elazar Z. Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. EMBO J. 2007, 26(7): 1749–60.

225. Lihuan D, Jingcun Z, Ning J, Guozeng W, Yiwei C, Wei L, *et al.* Photodynamic therapy with the novel photosensitizer chlorophyllin f induces apoptosis and autophagy in human bladder cancer cells. Lasers Surg Med. 2014, 46(4): 319–34.

226. Tu P, Huang Q, Ou Y, Du X, Li K, Tao Y, *et al.* Aloe-emodin-mediated photodynamic therapy induces autophagy and apoptosis in human osteosarcoma cell line MG-63 through the ROS/JNK signaling pathway. Oncol Rep. 2016, 35(6): 3209–15.

227. Xue Q, Wang X, Wang P, Zhang K, Liu Q. Role of p38MAPK in apoptosis and autophagy responses to photodynamic therapy with Chlorin e6. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2015, 12(1): 84–91.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

228. Wei M-F, Chen M-W, Chen K-C, Lou P-J, Lin SY-F, Hung S-C, *et al.* Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. Autophagy. 2014, 10(7): 1179–92.

229. Kessel D, Oleinick NL. Initiation of Autophagy by Photodynamic Therapy. Methods Enzymol. 2009, 453: 1–16.

230. Kessel D. Subcellular Targets for Photodynamic Therapy: Implications for Initiation of Apoptosis and Autophagy. J Natl Compr Cancer Netw JNCCN. 2012, 10(0 2): S56–9.

231. Caruso JA, Mathieu PA, Joiakim A, Leeson B, Kessel D, Sloane BF, *et al.* Differential susceptibilities of murine hepatoma 1c1c7 and Tao cells to the lysosomal photosensitizer NPe6: influence of aryl hydrocarbon receptor on lysosomal fragility and protease contents. Mol Pharmacol. 2004, 65(4): 1016–28.

232. Bouramtane S, Bretin L, Pinon A, Leger D, Liagre B, Richard L, *et al.* Porphyrin-xylan-coated silica nanoparticles for anticancer photodynamic therapy. Carbohydr Polym. 2019, 213: 168–75.

233. Lepage C, Léger DY, Bertrand J, Martin F, Beneytout JL, Liagre B. Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. Cancer Lett. 2011, 301(2): 193–202.

234. Guidance Document on Using *In Vitro* Data to Estimate *In Vivo* Starting Doses for Acute Toxicity. NIH Publication No. 01–4500. 2001. https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/guidance0801/iv_guide.pdf (consulté le 3 avril 2019).

235. Li J, Hou N, Faried A, Tsutsumi S, Kuwano H. Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer *in vitro* and *in vivo* model. Eur J Cancer. 2010, 46(10): 1900–9.

236. Secret E, Maynadier M, Gallud A, Gary-Bobo M, Chaix A, Belamie E, *et al.* Anionic porphyrin-grafted porous silicon nanoparticles for photodynamic therapy. Chem Commun Camb Engl. 2013, 49(39): 4202–4.

237. Youssef Z, Jouan-Hureaux V, Colombeau L, Arnoux P, Moussaron A, Baros F, *et al.* Titania and silica nanoparticles coupled to Chlorin e6 for anti-cancer photodynamic therapy. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2018, 22: 115–26.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

238. Bharathiraja S, Moorthy MS, Manivasagan P, Seo H, Lee KD, Oh J. Chlorin e6 conjugated silica nanoparticles for targeted and effective photodynamic therapy. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2017, 19: 212–20.

239. Brezániová I, Záruba K, Králová J, Sinica A, Adámková H, Ulbrich P, *et al.* Silica-based nanoparticles are efficient delivery systems for temoporfin. Photodiagnosis Photodyn Ther. 2018, 21: 275–84.

240. Asefa T, Tao Z. Biocompatibility of Mesoporous Silica Nanoparticles. Chem Res Toxicol. 2012, 25(11): 2265–84.

241. Shi Y, Miller ML, Pasqua AJD. Biocompatibility of Mesoporous Silica Nanoparticles? Comments Inorg Chem. 2016, 36(2): 61–80.

242. Hossen S, Hossain MK, Basher MK, Mia MNH, Rahman MT, Uddin MJ. Smart nanocarrier-based drug delivery systems for cancer therapy and toxicity studies: A review. J Adv Res. 2019, 15: 1–18.

243. Liu X, Sun J. Endothelial cells dysfunction induced by silica nanoparticles through oxidative stress via JNK/P53 and NF-kappaB pathways. Biomaterials. 2010, 31(32): 8198–209.

244. Sergent J-A, Paget V, Chevillard S. Toxicity and genotoxicity of nano-SiO2 on human epithelial intestinal HT-29 cell line. Ann Occup Hyg. 2012, 56(5): 622–30.

245. Cho M, Cho W-S, Choi M, Kim SJ, Han BS, Kim SH, *et al.* The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles. Toxicol Lett. 2009, 189(3): 177–83.

246. Kumar R, Roy I, Ohulchanskky TY, Vathy LA, Bergey EJ, Sajjad M, *et al. In vivo* biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles. ACS Nano. 2010, 4(2): 699–708.

247. Chan W-T, Liu C-C, Chiang Chiau J-S, Tsai S-T, Liang C-K, Cheng M-L, *et al. In vivo* toxicologic study of larger silica nanoparticles in mice. Int J Nanomedicine. 2017, 12: 3421–32.

248. Liu T, Li L, Teng X, Huang X, Liu H, Chen D, *et al.* Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice. Biomaterials. 2011, 32(6): 1657–68.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

249. Zhou CN. Mechanisms of tumor necrosis induced by photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B. 1989, 3(3): 299–318.

250. Skulachev VP. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. Mol Aspects Med. 1999, 20(3): 139–84.

251. Li X, Zhu F, Jiang J, Sun C, Wang X, Shen M, *et al.* Synergistic antitumor activity of withaferin A combined with oxaliplatin triggers reactive oxygen species-mediated inactivation of the PI3K/AKT pathway in human pancreatic cancer cells. Cancer Lett. 2015, 357(1): 219–30.

252. Baldea I, Olteanu DE, Bolfa P, Ion RM, Decea N, Cenariu M, *et al.* Efficiency of photodynamic therapy on WM35 melanoma with synthetic porphyrins: Role of chemical structure, intracellular targeting and antioxidant defense. J Photochem Photobiol B. 2015, 151: 142–52.

253. Roby A, Erdogan S, Torchilin VP. Enhanced *in vivo* antitumor efficacy of poorly soluble PDT agent, meso-tetraphenylporphine, in PEG-PE-based tumor-targeted immunomicelles. Cancer Biol Ther. 2007, 6(7): 1136–42.

254. Liao P-Y, Gao Y-H, Wang X-R, Bao L-L, Bian J, Hu T-S, *et al.* Tetraphenylporphyrin derivatives possessing piperidine group as potential agents for photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B. 2016, 165: 213–9.

255. Wu M, Wu L, Li J, Zhang D, Lan S, Zhang X, *et al.* Self-Luminescing Theranostic Nanoreactors with Intraparticle Relayed Energy Transfer for Tumor Microenvironment Activated Imaging and Photodynamic Therapy. Theranostics. 2019, 9(1): 20–33.

256. Janku F, McConkey DJ, Hong DS, Kurzrock R. Autophagy as a target for anticancer therapy. Nat Rev Clin Oncol. 2011, 8(9): 528–39.

257. Xiong L, Liu Z, Ouyang G, Lin L, Huang H, Kang H, *et al.* Autophagy inhibition enhances photocytotoxicity of Photosan-II in human colorectal cancer cells. Oncotarget. 2017, 8(4): 6419–32.

258. Zhu J, Tian S, Li K-T, Chen Q, Jiang Y, Lin H-D, *et al.* Inhibition of breast cancer cell growth by methyl pyropheophenylchlorin photodynamic therapy is mediated though endoplasmic reticulum stress-induced autophagy *in vitro* and *vivo*. Cancer Med. 2018, 7(5): 1908–20.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

259. Ma X, Qu Q, Zhao Y. Targeted delivery of 5-aminolevulinic acid by multifunctional hollow mesoporous silica nanoparticles for photodynamic skin cancer therapy. ACS Appl Mater Interfaces. 2015, 7(20): 10671–6.

260. Er Ö, Colak SG, Ocakoglu K, Ince M, Bresolí-Obach R, Mora M, *et al.* Selective Photokilling of Human Pancreatic Cancer Cells Using Cetuximab-Targeted Mesoporous Silica Nanoparticles for Delivery of Zinc Phthalocyanine. Mol Basel Switz. 2018, 23(11).

261. Biswas S, Torchilin VP. Nanopreparations for Organelle-Specific Delivery in Cancer. Adv Drug Deliv Rev. 2014, 66: 26–41.

262. Battogtokh G, Ko YT. Mitochondrial-targeted photosensitizer-loaded folate-albumin nanoparticle for photodynamic therapy of cancer. Nanomedicine Nanotechnol Biol Med. 2017, 13(2): 733–43.

263. Kramer L, Winter G, Baur B, Kuntz AJ, Kull T, Solbach C, *et al.* Quantitative and correlative biodistribution analysis of 89Zr-labeled mesoporous silica nanoparticles intravenously injected into tumor-bearing mice. Nanoscale. 2017, 9(27): 9743–53.

264. Baskaran R, Lee J, Yang S-G. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. Biomater Res. 2018, 22: 25.

265. Avci P, Gupta A, Sadasivam M, Vecchio D, Pam Z, Pam N, *et al.* Low-level laser (light) therapy (LLLT) in skin: stimulating, healing, restoring. Semin Cutan Med Surg. 2013, 32(1): 41–52.

266. Hatakeyama T, Murayama Y, Komatsu S, Shiozaki A, Kuriu Y, Ikoma H, *et al.* Efficacy of 5-aminolevulinic acid-mediated photodynamic therapy using light-emitting diodes in human colon cancer cells. Oncol Rep. 2013, 29(3): 911–6.

267. Zhang W, Shen J, Su H, Mu G, Sun J-H, Tan C-P, *et al.* Co-Delivery of Cisplatin Prodrug and Chlorin e6 by Mesoporous Silica Nanoparticles for Chemo-Photodynamic Combination Therapy to Combat Drug Resistance. ACS Appl Mater Interfaces. 2016, 8(21): 13332–40.

268. Zeng W, Liu P, Pan W, Singh SR, Wei Y. Hypoxia and hypoxia inducible factors in tumor metabolism. Cancer Lett. 2015, 356(2 Pt A): 263–7.

269. Dang J, He H, Chen D, Yin L. Manipulating tumor hypoxia toward enhanced photodynamic therapy (PDT). Biomater Sci. 2017, 5(8): 1500–11.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

270. Jahanban-Esfahlan R, de la Guardia M, Ahmadi D, Yousefi B. Modulating tumor hypoxia by nanomedicine for effective cancer therapy. J Cell Physiol. 2018, 233(3): 2019–31.

271. Graham K, Unger E. Overcoming tumor hypoxia as a barrier to radiotherapy, chemotherapy and immunotherapy in cancer treatment. Int J Nanomedicine. 2018, 13: 6049–58.

272. Lu N, Fan W, Yi X, Wang S, Wang Z, Tian R, *et al.* Biodegradable Hollow Mesoporous Organosilica Nanotheranostics for Mild Hyperthermia-Induced Bubble-Enhanced Oxygen-Sensitized Radiotherapy. ACS Nano. 2018, 12(2): 1580–91.

273. Gothié E, Pouysségur J. HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie. médecine/sciences. 2002, 18(1): 70–8.

274. Kopecka J, Porto S, Lusa S, Gazzano E, Salzano G, Giordano A, *et al.* Self-assembling nanoparticles encapsulating zoledronic acid revert multidrug resistance in cancer cells. Oncotarget. 2015, 6(31): 31461–78.

275. Johnson RL, Fleet JC. Animal models of colorectal cancer. Cancer Metastasis Rev. 2013, 32(1–2): 39–61.

276. McIntyre RE, Buczacki SJA, Arends MJ, Adams DJ. Mouse models of colorectal cancer as preclinical models. BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol. 2015, 37(8): 909–20.

277. Sharpless NE, Depinho RA. The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development. Nat Rev Drug Discov. 2006, 5(9): 741–54.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Table des illustrations

Figure 1 : localisation du gros intestin chez l'être humain 18
Figure 2 : organisation du gros intestin..... 19
Figure 3 : histologie du côlon 21
Figure 4 : histologie du canal anal 22
Figure 5 : incidence des cancers colorectaux en fonction de l'âge (2012) 25
Figure 6 : la colostomie..... 39
Figure 7 : les différentes colectomies 39
Figure 8 : laparotomie et cœlioscopie 40
Figure 9 : port-à-cath® 41
Figure 10 : la radiothérapie externe 43
Figure 11 : la curiethérapie 44
Figure 12 : mode d'action du bevacizumab 45
Figure 13 : la chimiothérapie hyperthermique intra-péritonéale à ventre ouvert 46
Figure 14 : la chimiothérapie intrapéritonéale pressurisée par aérosols 47
Figure 15 : propagation de la lumière de différentes longueurs d'onde dans les tissus..... 48
Figure 16 : principe de la thérapie photodynamique 49
Figure 17 : principe des 2 composantes de la thérapie photodynamique : la photothérapie et le photodiagnostic 50
Figure 18 : détection de tumeurs superficielles de la vessie lors d'une cystoscopie en fluorescence 51
Figure 19 : résection chirurgicale d'un glioblastome par photodiagnostic 51
Figure 20 : les 3 fondamentaux de la thérapie photodynamique 52
Figure 21 : diagramme de Jablonski 53
Figure 22 : les réactions photochimiques de type I..... 54
Figure 23 : les réactions photochimiques de type II 54
Figure 24 : exemples d'oxydation et de cycloaddition des composants cellulaires menant à la destruction de la tumeur..... 55
Figure 25 : relation entre la durée de vie, la réactivité et la distance de diffusion des espèces réactives de l'oxygène..... 56
Figure 26 : structure de l'hypéricine 57
Figure 27 : structure du bleu de méthylène..... 58
Figure 28 : structure du Photofrin® 59
Figure 29 : structure du Foscan® 61
Figure 30 : structure du Lutrin® 62

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Figure 31 : structure du Tookad® 63
Figure 32 : mécanisme d'action du Tookad® 63
Figure 33 : structure du Laserphyrin® 64
Figure 34 : structure de l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) et de la protoporphyrine IX (PpIX) 65
Figure 35 : biosynthèse de l'hème 65
Figure 36 : structure du complexe estradiol-tétraphénylporphyrine (TPP) 67
Figure 37 : structure du complexe acide folique-4-carboxyphénylporphyrine 68
Figure 38 : structure de de la protoporphyrine IX dispermidinée 68
Figure 39 : structure de la tétraphénylporphyrine substituée par 3 groupements mannose 69
Figure 40 : structure de la protoporphyrine IX substituée par un peptide RGD 69
Figure 41 : dispositif intra-rectal au moment de la PDT 71
Figure 42 : taille des nanoparticules comparée aux principales structures chimiques et biologiques 73
Figure 43 : la perméabilisation de l'endothélium vasculaire 76
Figure 44 : l'effet EPR 77
Figure 45 : liposome 78
Figure 46 : micelle 79
Figure 47 : poly(alkyl cyanoacrylate) 79
Figure 48 : monomère d'acide lactique et glycolique, copolymère le poly(acide lactique-co-acide glycolique) 80
Figure 49 : dendrimères 80
Figure 50 : structure de la chitine et du chitosane 81
Figure 51 : ciblage déclenché par aimant des nanoparticules magnétiques 82
Figure 52 : nanoparticules d'or 82
Figure 53 : nanoparticules de silice 84
Figure 54 : structure du polyéthylène glycol (PEG) 86
Figure 55 : structure du xylane 86
Figure 56 : mort cellulaire par nécrose ou par apoptose 91
Figure 57 : activité apoptotique défectueuse lors de la différentiation de deux orteils 92
Figure 58 : homologie de structure des caspases humaines 94
Figure 59 : activation des caspases 95
Figure 60 : voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort 97
Figure 61 : rôle de la mitochondrie dans la production d'énergie 99
Figure 62 : les protéines de la famille Bcl-2 100
Figure 63 : les 3 modèles de perméabilisation mitochondriale 101

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Figure 64 : voie intrinsèque ou voie mitochondriale 103
Figure 65 : les différentes formes d'autophagie 106
Figure 66 : l'initiation de l'autophagie 109
Figure 67 : les 2 modes d'élongation du phagophore 110
Figure 68 : l'étape de maturation et de fusion de l'autophagosome avec le lysosome..... 111
Figure 69 : effet de la TPPOH libre, des TPPOH-X SNPs et des SNPs sur la viabilité des cellules HCT116 130
Figure 70 : effet de la TPPOH libre, des TPPOH-X SNPs et des SNPs sur la viabilité des cellules HT-29..... 131
Figure 71 : effet de la TPPOH libre, des TPPOH-X SNPs et des SNPs sur la viabilité des cellules SW620 131
Figure 72 : tableau récapitulatif des IC_{50} calculées 132
Figure 73 : dosage des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules HCT116 133
Figure 74 : dosage des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules HT-29..... 134
Figure 75 : dosage des espèces réactives de l'oxygène dans les cellules SW620 135
Figure 76 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules HCT116 après 2 h de traitement 137
Figure 77 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules HCT116 après 6 h de traitement 137
Figure 78 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules HCT116 après 12 h de traitement 138
Figure 79 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules HCT116 après 24 h de traitement 138
Figure 80 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules HT-29 après 2 h de traitement..... 139
Figure 81 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules HT-29 après 6 h de traitement..... 139
Figure 82 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules HT-29 après 12 h de traitement..... 140
Figure 83 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules HT-29 après 24 h de traitement..... 140
Figure 84 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules SW620 après 2 h de traitement 141
Figure 85 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules SW620 après 6 h de traitement 141
Figure 86 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules SW620 après 12 h de traitement 142
Figure 87 : étude de l'internalisation cellulaire de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs sur les cellules SW620 après 24 h de traitement 142

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Figure 88 : étude en MET de l'internalisation et de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs sur les cellules HCT116 144

Figure 89 : étude en MET de l'internalisation et de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs sur les cellules HT-29 144

Figure 90 : étude en MET de l'internalisation et de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs sur les cellules SW620 145

Figure 91 : étude de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® sur les cellules HCT116 146

Figure 92 : étude de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® sur les cellules HT-29 147

Figure 93 : étude de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® sur les cellules SW620 148

Figure 94 : étude de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs par microscopie confocale sur les cellules HCT116 149

Figure 95 : étude de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs par microscopie confocale sur les cellules HT-29 150

Figure 96 : étude de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs par microscopie confocale sur les cellules SW620 151

Figure 97 : étude du potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules HCT116 153

Figure 98 : étude du potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules HT-29 153

Figure 99 : étude du potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules SW620 154

Figure 100 : étude du niveau d'apoptose dans les cellules HCT116 155

Figure 101 : étude du niveau d'apoptose dans les cellules HT-29 156

Figure 102 : étude du niveau d'apoptose dans les cellules SW620 157

Figure 103 : analyse quantitative des caspases 3/7 activées dans les cellules HCT116 159

Figure 104 : analyse quantitative des caspases 3/7 activées dans les cellules HT-29 160

Figure 105 : analyse quantitative des caspases 3/7 activées dans les cellules SW620 161

Figure 106 : analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN dans les cellules HCT116 162

Figure 107 : analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN dans les cellules HT-29 ... 163

Figure 108 : analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN dans les cellules SW620 .. 163

Figure 109 : analyse de la morphologie cellulaire des cellules HCT116 par MET 165

Figure 110 : analyse de la morphologie cellulaire des cellules HT-29 par MET 166

Figure 111 : analyse de la morphologie cellulaire des cellules SW620 par MET 167

Figure 112 : quantification de l'expression d'acteurs de l'autophagie dans les cellules HCT116 168

Figure 113 : quantification de l'expression d'acteurs de l'autophagie dans les cellules HT-29 169

Figure 114 : quantification de l'expression d'acteurs de l'autophagie dans les cellules SW620 170

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Figure 115 : analyse de l'autophagie dans les cellules HCT116 par MET 171
Figure 116 : analyse de l'autophagie dans les cellules HT-29 par MET 172
Figure 117 : analyse de l'autophagie dans les cellules SW620 par MET 172
Figure 118 : étude du niveau d'apoptose après inhibition de l'autophagie dans les cellules HCT116 173
Figure 119 : étude du niveau d'apoptose après inhibition de l'autophagie dans les cellules HT-29 174
Figure 120 : étude du niveau d'apoptose après inhibition de l'autophagie dans les cellules SW620 175
Figure 121 : analyse quantitative des caspases 3/7 activées après inhibition de l'autophagie dans les cellules HCT116 177
Figure 122 : analyse quantitative des caspases 3/7 activées après inhibition de l'autophagie dans les cellules HT-29 178
Figure 123 : analyse quantitative des caspases 3/7 activées après inhibition de l'autophagie dans les cellules SW620 179
Figure 124 : analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN après inhibition de l'autophagie dans les cellules HCT116 181
Figure 125 : analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN après inhibition de l'autophagie dans les cellules HT-29 181
Figure 126 : analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN après inhibition de l'autophagie dans les cellules SW620 182
Figure 127 : étude de la croissance tumorale 183
Figure 128 : étude du poids corporel 184
Figure 129 : photographies des souris et des tumeurs à la fin de l'étude 185
Figure 130 : étude du poids tumoral à la fin de l'étude 186
Figure 131 : étude de la morphologie et de la structure des tumeurs 187
Figure 132 : étude du niveau d'apoptose dans les tumeurs 188
Figure 133 : étude du niveau d'autophagie dans les tumeurs 189
Figure 134 : étude de la morphologie et de la structure des tumeurs à la fin de l'étude 189
Figure 135 : étude de la prolifération des cellules tumorales à la fin de l'étude 190
Figure 136 : étude de la biodistribution *in vivo* et *ex vivo* 191
Figure 137 : étude de la biocompatibilité des différents traitements 193

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Table des tableaux

Tableau 1 : classification TNM – La lettre T 30
Tableau 2 : classification TNM – La lettre N 31
Tableau 3 : classification TNM – La lettre M 33
Tableau 4 : classification TNM – Stade 0 33
Tableau 5 : classification TNM – Stade I 34
Tableau 6 : classification TNM – Stades IIA, IIB et IIC 34
Tableau 7 : classification TNM – Stades IIIA, IIIB et IIIC 35
Tableau 8 : classification TNM – Stades IVA, IVB et IVC 36
Tableau 9 : classification OMS de l'état général 36
Tableau 10 : recommandations thérapeutiques prévues suivant le stade multicritère du cancer colorectal 38

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Table des matières

Remerciements ... 3
Droits d'auteurs ... 7
Sommaire ... 8
Liste des abréviations ... 11
Introduction bibliographique ... 17
Chapitre I. Le cancer colorectal ... 18
I.1. Le gros intestin ... 18
I.1.1. Localisation, organisation et fonctions du gros intestin ... 18
I.1.2. Histologie du gros intestin ... 20
I.1.3. Pathologies du gros intestin ... 22
I.2. Le cancer colorectal ... 24
I.2.1. L'épidémiologie du cancer colorectal ... 24
I.2.2. Les facteurs de risque ... 25
I.2.2.1. Les personnes à risque moyen de cancer colorectal ... 25
I.2.2.2. Les personnes à risque élevé de cancer colorectal ... 26
I.2.2.3. Les personnes à risque très élevé de cancer colorectal ... 26
I.2.3. L'anatomopathologie ... 27
I.2.3.1. Les différentes formes de cancers colorectaux ... 27
I.2.3.2. La classification TNM ... 29
I.3. Les traitements ... 37
I.3.1. La chirurgie ... 38
I.3.2. La chimiothérapie ... 40
I.3.3. La radiothérapie ... 43
I.3.4. Les thérapies ciblées ... 44
I.3.5. Les nouvelles thérapies ... 46
Chapitre II. La thérapie photodynamique ... 49
II.1. Principe de la thérapie photodynamique ... 49
II.2. Les mécanismes de la thérapie photodynamique ... 49
II.3. Les réactions photochimiques ... 52
II.3.1. Les réactions photochimiques de type I ... 53
II.3.2. Les réactions photochimiques de type II ... 54
II.4. Le photo-blanchiment des photosensibilisateurs ... 56
II.5. Les photosensibilisateurs ... 57
II.5.1. Les PS non tétrapyrroliques ... 57
II.5.2. Les PS tétrapyrroliques ... 58
II.5.2.1. Les PS de première génération ... 58
II.5.2.2. Les PS de deuxième génération ... 60
II.5.2.3. Les PS de troisième génération ... 66
II.6. La thérapie photodynamique dans le traitement du cancer colorectal ... 70
Chapitre III. Les nanoparticules ... 73
III.1. Les nanoparticules ... 73
III.1.1. Historique des nanoparticules ... 73
III.1.2. Intérêts des nanoparticules ... 73
III.1.3. Applications des nanoparticules ... 74
III.2. L'effet EPR ... 75
III.3. Les différents types de nanoparticules ... 77

Licence CC BY-NC-ND 3.0

III.3.1. Les nanoparticules organiques 78
III.3.2. Les nanoparticules inorganiques 81
III.4. Les nanoparticules de première génération 84
III.5. Les nanoparticules de deuxième génération 85
III.6. Les nanoparticules de troisième génération 87
III.7. Les nanoparticules dans les traitements anticancéreux 87
III.8. Les nanoparticules et la thérapie photodynamique dans le traitement du cancer colorectal 89
Chapitre IV. L'apoptose 91
IV.1. Les rôles physiologiques de l'apoptose 92
IV.2. Les voies d'induction de l'apoptose 93
IV.2.1. Les caspases, acteurs clés de l'apoptose 93
IV.2.1.1. Structure des caspases 93
IV.2.1.2. Activation des caspases 94
IV.2.1.3. Action des caspases 95
IV.2.1.4. Régulation des caspases 96
IV.2.2. La voie des récepteurs de mort ou voie extrinsèque 96
IV.2.3. La voie mitochondriale ou voie intrinsèque 98
IV.2.3.1. La mitochondrie, acteur clé de la voie intrinsèque 98
IV.2.3.2. Les protéines de la famille Bcl-2 99
IV.2.3.3. La perméabilisation des membranes mitochondriales 100
IV.2.3.4. La voie intrinsèque dépendante des caspases 102
IV.2.3.5. La voie intrinsèque indépendante des caspases 104
IV.3. L'apoptose et la thérapie photodynamique anticancéreuse 104
Chapitre V. L'autophagie 106
V.1. Les différentes formes d'autophagie 106
V.1.1. La micro-autophagie 107
V.1.2. L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes 107
V.1.3. L'ADN/ARN autophagie 107
V.1.4. La macro-autophagie 107
V.2. Les étapes de la macro-autophagie 108
V.2.1. L'initiation 108
V.2.2. L'élongation 109
V.2.2.1. Le complexe d'élongation Atg12-Atg5-Atg16L1 110
V.2.2.2. Le complexe d'élongation LC3-PE 110
V.2.3. La maturation et la fusion de l'autophagosome avec le lysosome 111
V.3. Le rôle paradoxal de l'autophagie dans les cancers 112
V.3.1. L'autophagie, un suppresseur oncogénique 112
V.3.2. L'autophagie, un acteur pro-tumoral 113
V.4. L'autophagie et la thérapie photodynamique anticancéreuse 113
Projet de recherche 115
Matériels et méthodes 117
Chapitre I. Expérimentations *in vitro* 118
I.1. Matériels 118
I.2. Synthèse de la TPPOH libre et des TPPOH-X SNPs 118
I.3. Lignées et culture cellulaires 119
I.4. Traitements et irradiations 119
I.5. Étude de la viabilité cellulaire 119
I.6. Dosage du taux cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène 120

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.7. Étude de l'internalisation et de la localisation cellulaire 121
I.8. Analyses en microscopie électronique à transmission 121
I.9. Analyse de l'expression des protéines 122
I.9.1. Extraction des protéines 122
I.9.2. Expression des protéines 122
I.10. Étude de la mort cellulaire 123
I.10.1. Étude du potentiel membranaire mitochondrial 123
I.10.2. Analyse multiparamétrique de l'apoptose grâce à l'annexine V et l'iodure de propidium 124
I.10.3. Analyse quantitative des caspases 3/7 activées 124
I.10.4. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN 125
I.11. Analyses statistiques 125
Chapitre II. Expérimentations *in vivo* 126
II.1. Création d'un modèle de xénogreffe sous-cutanée de cancer colorectal humain 126
II.2. Traitements et irradiations 126
II.3. Étude de l'efficacité anti-tumorale et de la biocompatibilité 127
II.4. Analyse de la biodistribution 127
II.5. Déclaration éthique 128
II.6. Analyses statistiques 128
Partie expérimentale 129
Chapitre I. Expérimentations *in vitro* 130
I.1. Étude de la viabilité cellulaire 130
I.2. Dosage du taux cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène 133
I.3. Étude de l'internalisation cellulaire 136
I.4. Étude de l'internalisation et de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs par MET 143
I.5. Étude de la localisation cellulaire des TPPOH-X SNPs 145
I.6. Étude du potentiel membranaire mitochondrial 152
I.7. Étude du niveau d'apoptose 155
I.8. Analyse quantitative des caspases 3/7 activées 158
I.9. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN 162
I.10. Analyse de la morphologie cellulaire par MET 164
I.11. Quantification de l'expression d'acteurs de l'autophagie 167
I.11. Analyse de l'autophagie par MET 171
I.12. Étude du niveau d'apoptose après inhibition de l'autophagie 173
I.13. Analyse quantitative des caspases 3/7 activées après inhibition de l'autophagie 176
I.14. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN après inhibition de l'autophagie 180
Chapitre II. Expérimentations *in vivo* 183
I.1. Étude de la croissance tumorale 183
I.2. Étude de la morphologie et de la structure des tumeurs 186
I.3. Étude du niveau d'apoptose dans les tumeurs 187
I.4. Étude du niveau d'autophagie dans les tumeurs 188
I.5. Étude de la morphologie et de la structure des tumeurs en fin d'étude 189
I.6. Étude de la prolifération des cellules tumorales en fin d'étude 190
I.7. Étude de la biodistribution 191
I.8. Étude de la biocompatibilité 192
Discussion 194
I.1. Intérêt de la vectorisation de la TPPOH par des SNPs 195

Licence CC BY-NC-ND 3.0

I.2. Biocompatibilité et toxicité des SNPs 197
I.3. Mécanismes de mort cellulaire induits par la PDT 198
I.4. Mécanisme de résistance à l'apoptose induite par la PDT 199
Conclusions et perspectives 201
Références bibliographiques 207
Table des illustrations 233
Table des tableaux 238
Table des matières 239
Publications 243

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Publications

- **Ludovic Bretin**, Aline Pinon, Soukaina Bouramtane, Catherine Ouk, Laurence Richard, Marie-Laure Perrin, Alain Chaunavel, Claire Carrion, Frédérique Bregier, Vincent Sol, Vincent Chaleix, David Yannick Leger, Bertrand Liagre

  "Photodynamic Therapy Activity of New Porphyrin-Xylan-Coated Silica Nanoparticles in Human Colorectal Cancer"

  Cancers 2019, Impact Factor: 6.162

- Soukaina Bouramtane, **Ludovic Bretin**, Aline Pinon, David Yannick Leger, Bertrand Liagre, Laurence Richard, Frédérique Bregier, Vincent Sol, Vincent Chaleix

  "Porphyrin-xylan-coated silica nanoparticles for anticancer photodynamic therapy"

  Carbohydrate Polymers 2019, Impact Factor: 6.044

  - Dans cette étude, j'ai réalisé de façon concomitante à mes travaux princeps de recherche les études de viabilité cellulaire ainsi que les analyses de la morphologie cellulaire par MET des 2 composés sur les lignées cellulaires de CCR humain HCT116 et HT-29.

- Gautier Mark-Arthur Ndong Ntoutoume, Robert Granet, Jean-Pierre Mbakidi, **Ludovic Bretin**, David Yannick Leger, Bertrand Liagre, Frédérique Bregier, Vincent Chaleix, Vincent Sol

  "Zinc protoporphyrin IX derivatives bearing one or two adamantane groups: facile synthesis, encapsulation into cyclodextrin/cellulose nanocrystals complexes and phototoxic activity against HT-29 colorectal cancer cell line"

  ChemMedChem 2019, Impact Factor: 3.016 (en soumission)

  - Dans cette étude, j'ai réalisé les études d'internalisation cellulaire des 4 composés sur la lignée cellulaire de CCR humain HT-29.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

cancers

MDPI

Article

Photodynamic Therapy Activity of New Porphyrin-Xylan-Coated Silica Nanoparticles in Human Colorectal Cancer

Ludovic Bretin [1], Aline Pinon [1], Soukaina Bouramtane [2], Catherine Ouk [3], Laurence Richard [4], Marie-Laure Perrin [5], Alain Chaunavel [4], Claire Carrion [3], Frédérique Bregier [2], Vincent Sol [2], Vincent Chaleix [2], David Yannick Leger [1] and Bertrand Liagre [1,*]

1 Laboratoire PEIRENE EA 7500, Faculté de Pharmacie, Université de Limoges 2, Rue du Docteur Raymond Marcland, 87025 Limoges Cedex, France; ludovic.bretin@unilim.fr (L.B.); aline.pinon@unilim.fr (A.P.); david.leger@unilim.fr (D.Y.L.)

2 Laboratoire PEIRENE EA 7500, Faculté des Sciences & Techniques, Université de Limoges 123, Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges Cedex, France; soukaina.bouramtane@unilim.fr (S.B.); frederique.bregier@unilim.fr (F.B.); vincent.sol@unilim.fr (V.S.); vincent.chaleix@unilim.fr (V.C.)

3 BISCEm Pôle Cytométrie en flux/Microscopie, Université de Limoges 2, Rue du Docteur Raymond Marcland, 87025 Limoges Cedex, France; catherine.ouk@unilim.fr (C.O.); claire.carrion@unilim.fr (C.C.)

4 Service d'Anatomie Pathologique, Centre Hospitalier Universitaire de Limoges 2, Avenue Martin Luther King, 87042 Limoges Cedex, France; laurence.richard@unilim.fr (L.R.); alain.chaunavel@chu-limoges.fr (A.C.)

5 Laboratoire Bio EM XLIM UMR CNRS 7252, Faculté de Médecine, Université de Limoges 2, Rue du Docteur Raymond Marcland, 87025 Limoges Cedex, France; marie-laure.perrin@unilim.fr

* Correspondence: bertrand.liagre@unilim.fr

Received: 17 September 2019; Accepted: 28 September 2019; Published: 30 September 2019

check for updates

Abstract: Photodynamic therapy (PDT) using porphyrins has been approved for treatment of several solid tumors due to the generation of cytotoxic reactive oxygen species (ROS). However, low physiological solubility and lack of selectivity towards tumor sites are the main limitations of their clinical use. Nanoparticles are able to spontaneously accumulate in solid tumors through an enhanced permeability and retention (EPR) effect due to leaky vasculature, poor lymphatic drainage, and increased vessel permeability. Herein, we proved the added value of nanoparticle vectorization on anticancer efficacy and tumor-targeting by 5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (TPPOH). Using 80 nm silica nanoparticles (SNPs) coated with xylan-TPPOH conjugate (TPPOH-X), we first showed very significant phototoxic effects of TPPOH-X SNPs mediated by post-PDT ROS generation and stronger cell uptake in human colorectal cancer cell lines compared to free TPPOH. Additionally, we demonstrated apoptotic cell death induced by TPPOH-X SNPs-PDT and the interest of autophagy inhibition to increase anticancer efficacy. Finally, we highlighted in vivo, without toxicity, elevated anticancer efficacy of TPPOH-X SNPs through improvement of tumor-targeting compared to a free TPPOH protocol. Our work demonstrated for the first time the strong anticancer efficacy of TPPOH in vitro and in vivo and the merit of SNPs vectorization.

Keywords: anticancer drug; porphyrin; silica nanoparticles; drug delivery; photodynamic therapy

1. Introduction

In 2018, colorectal cancer (CRC) was the third most common cancer with 1.8 million cases globally, and the second leading cause of death for oncological reasons with 862,000 deaths [1]. The conventional treatment options for patients with CRC are surgery, chemotherapy, and/or

Licence CC BY-NC-ND 3.0

radiotherapy, which unfortunately has many side effects and long recovery periods. Over the past decade, significant progress in CRC treatment has been achieved through the development of novel drugs and treatment protocols. However, the increasing resistance of tumor cells toward these novel drugs and persistent side effects due to toxicity on healthy tissues make it imperative to find other methods of CRC therapy [2–6].

Photodynamic therapy (PDT), an alternative cancer treatment, appears to be a promising option [7]. The molecular mechanism of PDT involves simultaneous interaction between a photosensitizer (PS), a light source with an appropriate wavelength, and molecular oxygen. Relative to traditional therapies, PDT has several advantages including non-invasive therapy, non-cytotoxic molecules without light activation, and site-specific light treatment which decreases the side effects, thus accelerating the healing process [8,9]. PDT is based on the generation of reactive oxygen species (ROS) which mediate cellular toxicity. Upon light irradiation, the PS is activated from a ground to an excited state. The excited PS is very unstable and loses its excess energy either directly or via the excited triplet state. The excited triplet state is generated by intersystem crossing. In this long-lived excited triplet state, the PS slowly returns to the ground state through type I or type II photochemical reactions. In the first reaction, the excited PS reacts with a biological substrate via hydrogen or electron transfer, producing free radical species. These species can react with molecular oxygen producing ROS such as the superoxide radical anion ($O_2^{\bullet-}$) and hydrogen peroxide (H_2O_2). In the second reaction, the excited PS transfers its energy directly to molecular oxygen to form singlet oxygen ($^1O_2$). These highly cytotoxic ROS can oxidize a variety of biomolecules, induce an acute stress response, and trigger a series of redox signaling pathways, leading to cell death frequently through apoptosis [10–13]. At present, tetrapyrrole compounds such as porphyrins, chlorins, bacteriochlorins, and phthalocyanines are the most commonly used PS in PDT [14]. However, the main disadvantages of these PS are their poor solubility in water, which limits intravenous administration, their low photo-physical properties due to the aggregation of PS, and their poor tumor selectivity limiting their use in clinical protocols.

In order to increase the selectivity and bioavailability of PS, new drug delivery systems are emerging. Nanotechnology using nanocarriers appears to be the most promising strategy. Nanoparticles (NPs) are able to spontaneously accumulate in solid tumors through passive targeting: the enhanced permeability and retention (EPR) effect occurs due to a combination of leaky vasculature, poor lymphatic drainage, and increased vessel permeability. Vectorizing NPs through encapsulation or attachment of PS not only enhances tumor-targeting through the EPR effect but also increases the hydrophilicity and tissue lifetime of PS [15–18]. Recently, various nanocarriers have been developed using organic and inorganic strategies. Organic drug delivery systems suffer from intrinsic instability and low drug-loading capacity/efficiency, restricting their further clinical potential. However, inorganic NPs show high chemical stability and resistance to corrosion under physiological conditions. Among these inorganic NPs, silica nanoparticles (SNPs) have been recognized as promising nanocarriers for PDT. SNPs have numerous advantages such as their easy synthesis, stability, controllable size, modifiable surface potential and easy functionalization. One of the major issues of inorganic NPs is biocompatibility. SNPs are one of the most biocompatible materials, thereby increasing interest in their use for medical applications [19–22].

One of the biggest challenges in controlled drug delivery systems is blood circulation half-life due to mononuclear phagocyte sequestration. To delay opsonization and increase nanocarrier lifetimes in the bloodstream, coating NPs with hydrophilic groups appears to be a promising strategy. This strategy involves grafting long chain polymers such as polyethylene glycol or polysaccharides on NPs. These polymers create a protective hydrophilic layer around the NPs which prevents the binding of opsonins via steric repulsion forces, thus delaying opsonization and phagocytosis of NPs [23–25]. Xylan, a hemicellulose, is defined as a group of cell wall polysaccharides. Xylan is a natural, biodegradable, and non-toxic biomaterial which has been reported to stabilize magnetic NPs in biological media with improvement of their biocompatibility and biodistribution [26,27]. Xylan has been also demonstrated to play an important function in drug delivery. Esterification of xylan via activation of carboxylic acid with N,N′-carbonyldiimidazole produces prodrugs for the controlled release of ibuprofen [28].

Licence CC BY-NC-ND 3.0

In the current paper, we investigated the anticancer efficacy of the PS 5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (TPPOH). According to our research program on polysaccharide modifications with PS for PDT applications, we explored the newly synthesized core-shell hybrid SNPs based on xylan for the targeted delivery of TPPOH [29]. First, we showed a strong anticancer efficacy of TPPOH in human CRC cell lines, which has not been described before. Then, we demonstrated that vectorizing SNPs enhances TPPOH anticancer efficacy through increased uptake and ROS production due to optimal hydrophilicity and no aggregation of TPPOH. Subsequently, like other PDT studies, our results indicated that TPPOH achieves its anticancer efficacy through apoptosis. Because autophagy is frequently involved in PDT and plays a role in resistance to anticancer treatment [30,31], we established that inhibition of PDT-induced autophagy by pharmacological inhibitor markedly increases apoptosis. Finally, we highlighted that SNPs vectorization enhances TPPOH tumor cytotoxicity in a CRC xenograft mice model through better tumor-targeting due to the EPR effect. Together, the in vitro and in vivo results revealed the strong anticancer efficacy of TPPOH-X SNPs and showed strong potential for possible clinical use in further PDT therapies.

2. Results

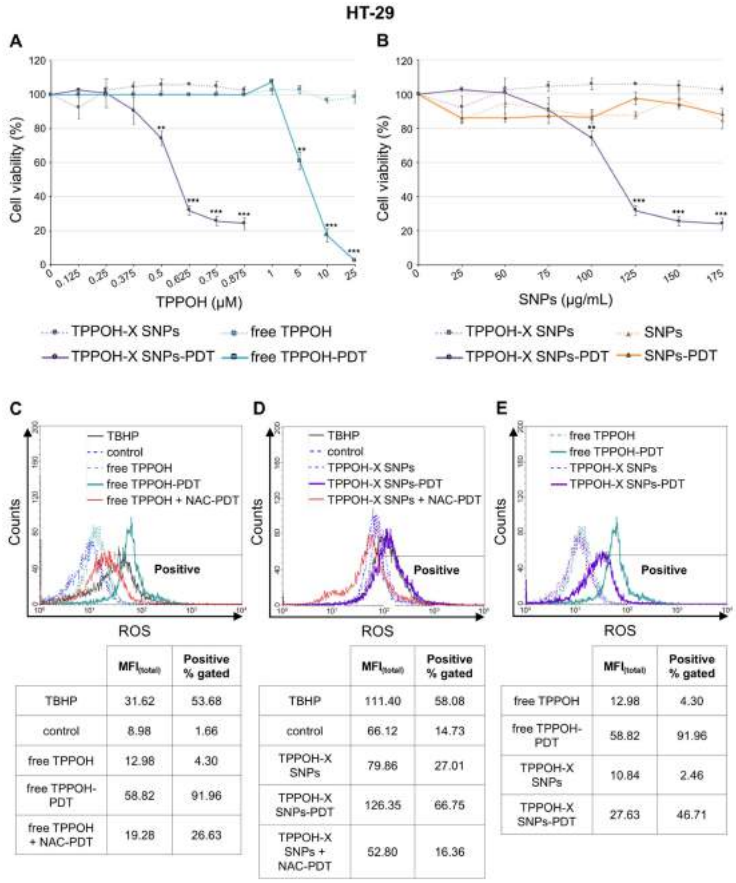
2.1. SNPs Vectorization Enhanced TPPOH-PDT Phototoxic Effects Mediated by ROS Production

To examine the phototoxicity of TPPOH-PDT in vitro, we treated three human CRC cell lines: HT-29, HCT116, and SW620 with free TPPOH or TPPOH-X SNPs. Then, cells were exposed or not to PDT with red irradiation and phototoxic effects were determined 48 h post-PDT, using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay. Free TPPOH and TPPOH-X SNPs had no toxic effects on HT-29 cells when cells were kept in the dark (Figure 1A). When photoactivated, free TPPOH or TPPOH-X SNPs induced a strong decrease in cell viability in a dose-dependent manner (Figure 1A). However, TPPOH-X SNPs-PDT was more effective than free TPPOH-PDT. SNPs alone had no toxic effect with or without photoactivation regardless of the concentrations tested (Figure 1B). The same results were seen in HCT116 (Figure S1A,B) and SW620 (Figure S2A,B) cell lines.

IC_{50} values were calculated in order to compare free TPPOH-PDT vs. TPPOH-X SNPs-PDT. We observed that TPPOH-X SNPs-PDT was much more effective than free TPPOH-PDT in HT-29 cells with 10.8-fold more cytotoxicity with IC_{50} values of 550.2 nM for TPPOH-X SNPs-PDT and around 6 μM for free TPPOH-PDT [29]. Similar results were observed in HCT116 (40.5-fold) and SW620 (39.5-fold) cell lines with respective IC_{50} values of 72.6 and 75.4 nM for TPPOH-X SNPs-PDT and around 3 μM for free TPPOH-PDT. HT-29 cells appeared to be the most resistant as IC_{50} values for free TPPOH-PDT and TPPOH-X SNPs-PDT were higher than those found for HCT116 and SW620 cell lines (2- and 7-fold respectively). For the following experiments, compounds were used at IC_{50} values except for during uptake and localization experiments.

PDT-induced cell death generally occurs through generation of intracellular ROS. Therefore, we measured intracellular ROS levels using 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) staining 4 h post-PDT. Flow cytometry analyses indicated that exposure of cells to free TPPOH enhanced intracellular ROS levels only after photoactivation (Figure 1C). The median fluorescence intensity of 2′,7′-dichlorofluorescein (DCF) after photoactivated free TPPOH treatment was increased compared to free TPPOH and control and was decreased after pretreatment with the ROS scavenger: NAC. After SNPs vectorization, TPPOH-X SNPs also enhanced intracellular ROS levels only after photoactivation. Pretreatment with NAC decreased further the median fluorescence intensity of DCF (Figure 1D). Free TPPOH-PDT was more effective on ROS generation than TPPOH-X SNPs (Figure 1E). In fact, it is well-known complexation of PS to NPs often leads to a decrease of ROS generation through PS quenching [32,33]. TBHP was used as a positive control. The same results were observed in HCT116 (Figure S1C–E) and SW620 (Figure S2C–E) cell lines.

Licence CC BY-NC-ND 3.0



	$MFI_{(total)}$	Positive % gated
TBHP	31.62	53.68
control	8.98	1.66
free TPPOH	12.98	4.30
free TPPOH-PDT	58.82	91.96
free TPPOH + NAC-PDT	19.28	26.63

	$MFI_{(total)}$	Positive % gated
TBHP	111.40	58.08
control	66.12	14.73
TPPOH-X SNPs	79.86	27.01
TPPOH-X SNPs-PDT	126.35	66.75
TPPOH-X SNPs + NAC-PDT	52.80	16.36

	$MFI_{(total)}$	Positive % gated
free TPPOH	12.98	4.30
free TPPOH-PDT	58.82	91.96
TPPOH-X SNPs	10.84	2.46
TPPOH-X SNPs-PDT	27.63	46.71

Figure 1. In vitro phototoxic effects of 5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (TPPOH)-X silica nanoparticles (SNPs)- Photodynamic therapy (PDT) and reactive oxygen species (ROS) production. (**A**) HT-29 cells were treated or not treated with free TPPOH and TPPOH-X SNPs based on TPPOH concentration. Then, cells were exposed or were not exposed to PDT. Phototoxic effects were determined 48 h post-PDT using the MTT assay. Cell viability, expressed as a percentage of each condition, was compared to controls. IC_{50} values were calculated using 550.2 nM for TPPOH-X SNPs-PDT and around 6 µM for free TPPOH-PDT. (**B**) HT-29 cells were treated or not treated with TPPOH-X SNPs and SNPs based on nanoparticles concentration. Then, cells were exposed or not exposed to PDT. Phototoxic effects were determined 48 h post-PDT using the MTT assay. Cell viability, expressed as a percentage of each condition, was compared to controls. (**C**) HT-29 cells were treated or not treated with free TPPOH or (**D**) TPPOH-X SNPs with or without NAC co-treatment and then photoactivated or not photoactivated. (**E**) Comparison of free TPPOH and TPPOH-X SNPs on ROS generation in HT-29 cells. Intracellular ROS levels using DCFDA staining were measured 4 h post-PDT by flow cytometry. A greater right shift implied higher fluorescence intensity resulting from higher amounts of 2′,7′-dichlorofluorescein (DCF) formation and thus greater ROS generation. Data are shown as mean ± SEM (n = 3). ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

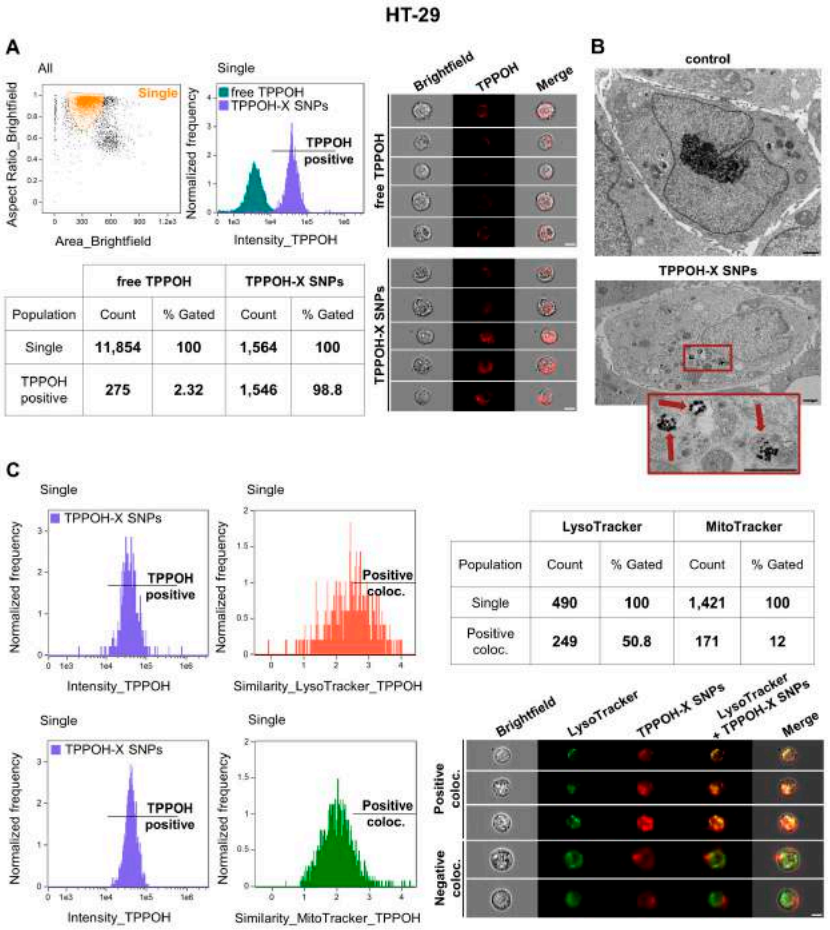
2.2. SNPs Vectorization Increased TPPOH Accumulation in Lysosomes

To explore the large difference in IC_{50} values between TPPOH-X SNPs-PDT and free TPPOH-PDT, we studied the uptake of these compounds through a kinetics study in human CRC cell lines by using AMNIS® imaging flow cytometry analysis. The results demonstrated that, used at the same concentration (1 μM), TPPOH-X SNPs uptake was much higher in HT-29 cells than that of free TPPOH with 98.8% vs. 2.32%, respectively, 24 h post-treatment (Figure 2A). The same results were observed at 2, 6, and 12 h post-treatment (data not shown). TPPOH fluorescence (red) was clearly observed in cell cytoplasm, indicating cellular internalization. The same results were demonstrated in HCT116 (Figure S3A) and SW620 (Figure S4A) cell lines for TPPOH-X SNPs and free TPPOH with 99.9% vs. 0.53% and 99.8% vs. 0.9%, respectively.

To visualize uptake on a single cell level, TEM analysis was used to evaluate the localization of TPPOH-X SNPs (Figure 2B). Images showed TPPOH-X SNPs uptake without cellular morphological changes. TPPOH-X SNPs seemed to be internalized by lysosomes probably by endocytosis and/or diffusion through cell membranes. TPPOH-X SNPs internalization seemed to be the same for HCT116 (Figure S3B) and SW620 (Figure S4B) cell lines.

Then cells were co-treated with TPPOH-X SNPs and LysoTracker or MitoTracker. Results demonstrated that TPPOH-X SNPs co-localized preferentially with lysosomes (50.8%) compared to mitochondria (12%) in HT-29 cells (Figure 2C). TPPOH-X SNPs co-localized similarly in HCT116 (Figure S3C) and SW620 (Figure S4C) cell lines with lysosomes at 49.7% and 59.3% compared to mitochondria at 15% and 5.4%, respectively. TPPOH-X SNPs fluorescence co-localized preferably with LysoTracker fluorescence, as indicated by yellow fluorescence. TPPOH-X SNPs lysosomal localization was confirmed by confocal microscopy in HT-29 (Figure S5A), HCT116 (Figure S6A) and SW620 (Figure S7A) cell lines. In addition, confocal microscopy analysis revealed no co-localization between TPPOH-X SNPs and mitochondria in HT-29 (Figure S5B), HCT116 (Figure S6B), and SW620 (Figure S7B) cell lines. These data showed that SNPs vectorization enhanced cellular uptake and lysosome internalization compared to free TPPOH.

Licence CC BY-NC-ND 3.0



	free TPPOH		TPPOH-X SNPs	
Population	Count	% Gated	Count	% Gated
Single	11,854	100	1,564	100
TPPOH positive	275	2.32	1,546	98.8

	LysoTracker		MitoTracker	
Population	Count	% Gated	Count	% Gated
Single	490	100	1,421	100
Positive coloc.	249	50.8	171	12

Figure 2. Cell uptake of TPPOH-X SNPs by HT-29 cells. (**A**) HT-29 cells were treated with free TPPOH and TPPOH-X SNPs at 1 μM and cell uptake of these compounds was studied 24 h post-treatment by AMNIS® imaging flow cytometry. The first graph highlights the size/structure of HT-29 cells. After selection of the cell population, TPPOH intensity in HT-29 cells was shown in the second graph and in representative images. The table summarizes the amount of positive TPPOH cells relative to all cells compared to free TPPOH and TPPOH-X SNPs treatments. White scale bar = 10 μm. (**B**) Representative TEM images of HT-29 cells treated or not treated with TPPOH-X SNPs 24 h post-treatment are shown. Red arrows indicate intracellular nanoparticles. Black scale bar = 1 μm. (**C**) HT-29 cells were co-treated with TPPOH-X SNPs and LysoTracker or MitoTracker and co-localization was studied 24 h post-treatment by using AMNIS® imaging flow cytometry analysis. The first graph shows TPPOH intensity in HT-29 cells and the second graph shows similarity of TPPOH positive cells compared to LysoTracker or MitoTracker. The table summarizes the amount of TPPOH positive cells co-localized with LysoTracker or MitoTracker. Representative images of co-localization of TPPOH-X SNPs and LysoTracker in HT-29 cells are shown. White scale bar = 10 μm. Data are shown as three independent experiments.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

2.3. TPPOH-X SNPs-PDT Induced Apoptosis

To determine the mechanism of the decrease in cell viability induced by TPPOH-X SNPs-PDT on human CRC cell lines, mitochondrial membrane potential was evaluated by flow cytometry using the cationic dye JC-1. In control cells, JC-1 forms J-aggregates in mitochondria. In apoptotic cells, JC-1 accumulates in the cytoplasm as monomers due to collapse of the mitochondrial membrane potential. Mitochondria predominantly exhibited accumulation of J-aggregates in HT-29 cells after light control or TPPOH-X SNPs treatment (Figure 3A). TPPOH-X SNPs-PDT disrupted mitochondrial membrane potential as revealed by an increase in monomer rates: 14.4% compared to 6.6% and 7.3% for light control and TPPOH-X SNPs, respectively. The same increase in monomer rates were demonstrated in HCT116 cells (Figure S8A) with 42.6% compared to 6.3% and 7.2% and SW620 cells (Figure S9A) with 22.7% compared to 0.8% and 1.1% for TPPOH-X SNPs-PDT relative to light control and TPPOH-X SNPs treatments, respectively.

Consequently, the rate of apoptosis induced by TPPOH-X SNPs-PDT was determined by dual staining with Annexin V-FITC and PI by flow cytometry. In HT-29 cells, light control and TPPOH-X SNPs treated cells were mostly viable, whereas the rate of early and late apoptosis simultaneously increased with TPPOH-X SNPs-PDT to 20.7% compared to 12.8% and 12% for light control and TPPOH-X SNPs, respectively (Figure 3B). HCT116 and SW620 cells were more sensitive than HT-29 cells. TPPOH-X SNPs-PDT increased the rate of early and late apoptosis to 33.8% compared to 15% and 14% in HCT116 cells (Figure S8B) and to 30.4% compared to 12.1% and 15.1% in SW620 cells (Figure S9B) for TPPOH-X SNPs-PDT relative to light control and TPPOH-X SNPs, respectively.

To further confirm that TPPOH-X SNPs-PDT induced apoptosis, we characterized the effects of TPPOH-X SNPs-PDT on activity of the key apoptosis executioner caspase-3/7 by IncuCyte imaging live cell analysis. HT-29 cells submitted to TPPOH-X SNPs-PDT showed a significant increase in caspase-3/7 activity in a time-dependent manner compared to light control or TPPOH-X SNPs (Figure 3C). At 48 h, TPPOH-X SNPs-PDT induced a significant increase in caspase-3/7 activity by 4.6-fold ± 0.2-fold compared to light control. The same results were observed in HCT116 (Figure S8C) and SW620 (Figure S9C) cell lines with a significant increase in caspase-3/7 activity by 4.1-fold ± 0.1-fold and by 4.4-fold ± 0.1-fold, respectively, compared to light control.

Furthermore, to study the nuclear changes in apoptosis caused by TPPOH-X SNPs-PDT, DNA fragmentation was evaluated by ELISA. TPPOH-X SNPs-PDT treatment induced a significant increase in DNA fragmentation by 2.9-fold ± 0.2-fold compared to light control or TPPOH-X SNPs in HT-29 cells (Figure 3D). The same results were seen in HCT116 (Figure S8D) and SW620 (Figure S9D) cell lines with a significant increase in DNA fragmentation by 2.5-fold ± 0.1-fold and by 2.4-fold ± 0.1-fold, respectively, compared to light control.

TEM was also used to assess the apoptotic effects of TPPOH-X SNPs-PDT. The results showed that HT-29 (Figure 3E), HCT116 (Figure S8E) and SW620 cells (Figure S9E) treated with light control and TPPOH-X SNPs exhibited normal morphology with intact cell structures and undamaged nuclei. However, human CRC cell lines submitted to TPPOH-X SNPs-PDT showed a complete breakdown of intracellular structures. These cells exhibited morphological features such as cell membrane shrinkage, nuclear condensation and formation of phagocytic vesicles, or apoptotic bodies, which are hallmarks of apoptosis. These results demonstrated that TPPOH-X SNPs-PDT induced death of human CRC cell lines through apoptosis.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

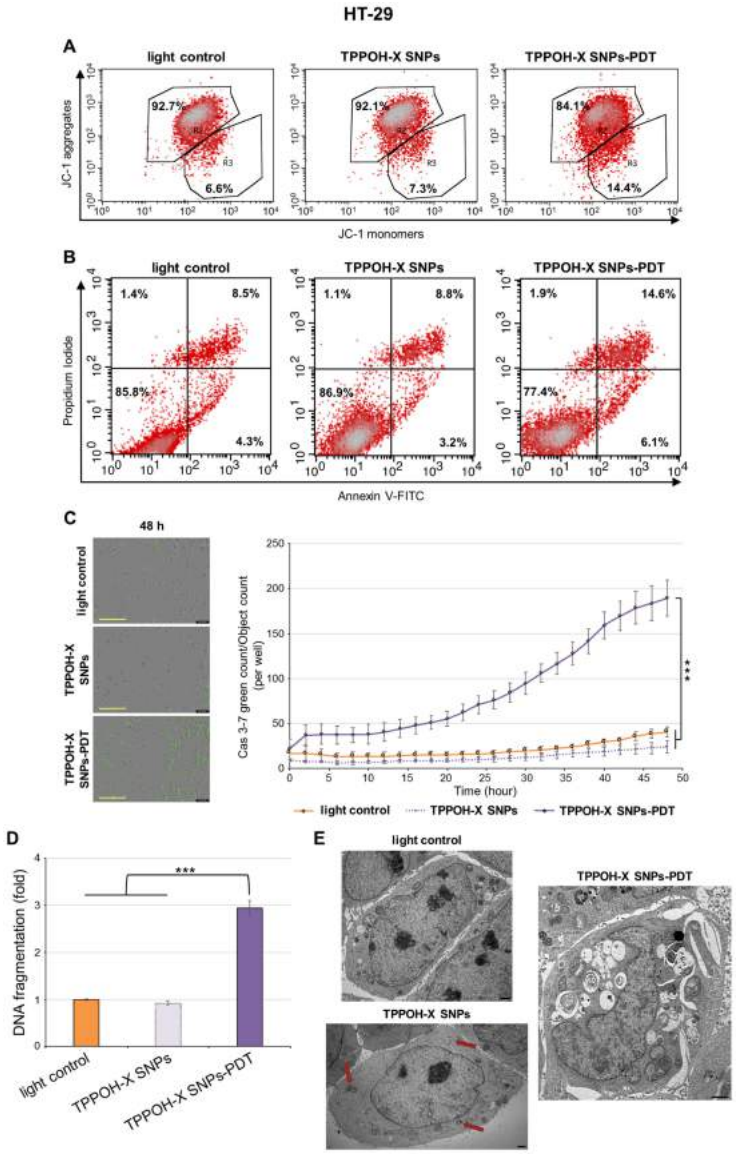


Figure 3. Effects of TPPOH-X SNPs-PDT on HT-29 cell line apoptosis. (**A**) HT-29 cells were treated or not treated with TPPOH-X SNPs and then photoactivated or not photoactivated. The mitochondrial membrane potential was analyzed by flow cytometry with JC-1 at 48 h post-PDT. R2 represents the aggregate ratio and R3 represents the monomer ratio. (**B**) HT-29 cells were also stained, 48 h post-PDT, with Annexin V-FITC and PI, and apoptosis was analyzed by flow cytometry. The upper right quadrant represents the percentage of late apoptosis, and the lower right quadrant represents early apoptosis.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

(**C**) Caspase-3/7 activity, with the same conditions in HT-29 cells, was evaluated every 2 h during 48 h post-PDT by IncuCyte imaging live cell analysis and green count/cell count/well are shown. Representative images at 48 h post-PDT are shown. Yellow scale bar = 400 μm. (**D**) DNA fragmentation in HT-29 cells 48 h post-PDT was quantified from cytosol extracts by ELISA. Results are reported as n-fold compared to light control. (**E**) Representative TEM images of HT-29 cells treated or not treated with TPPOH-X SNPs and photoactivated or not 48 h post-PDT were shown. Red arrows indicate intracellular nanoparticles. Black scale bar = 1 μm. Data are shown as mean ± SEM (n = 3). *** $p < 0.001$.

2.4. Autophagy Inhibition Enhanced TPPOH-X SNPs-PDT-Induced Apoptosis

For all Western blot figures, please include densitometry readings/intensity ratio of each band; please include the whole blot showing all the bands with all molecular weight markers on the Western area in the Supplementary Materials section.

Because autophagy is often involved during PDT-treatments, we studied TPPOH-X SNPs-PDT effects on autophagy. Western blotting was performed on autophagy-related proteins, Beclin-1, and Atg5, two key regulators of autophagy and light chain 3 (LC3) forms which are involved in autophagosome formation. The results demonstrated that HT-29 cells expressed a slight increase in Beclin-1 and Atg5 protein levels and induced a higher conversion of LC3-I into LC3-II after TPPOH-X SNPs-PDT compared to light control, resulting in autophagy activation (Figure 4A). Then we used a pharmacological inhibitor of autophagy as co-treatment: 3-MA, which can block the early steps of autophagy. Cells treated with TPPOH-X SNPs + 3-MA-PDT expressed lower levels of autophagy-related proteins compared to cells exposed to TPPOH-X SNPs-PDT without co-treatment with 3-MA. Similar results were obtained in HCT116 (Figure S10A) and SW620 cells (Figure S11A).

Next, to confirm the induction of autophagy, cells were examined by TEM. Light control cells had an integrated cell nucleus and discrete organelles. However, HT-29 (Figure 4B), HCT116 (Figure S10B), and SW620 cells (Figure S11B) exposed to TPPOH-X SNPs-PDT were seriously damaged with clear cytoplasm vacuolization, with many membrane-bound vesicles containing organelles, cellular fragments, and double-membrane autophagosomes.

To determine whether this autophagy induction is a key mediator in resistance to TPPOH-X SNPs-PDT in human CRC cells, we examined whether inhibition of autophagy by 3-MA enhanced TPPOH-X SNPs-PDT-induced apoptosis. First, effects of co-treatment with 3-MA on the rate of apoptosis were evaluated by dual staining with Annexin V-FITC and PI by flow cytometry. In HT-29 cells, TPPOH-X SNPs + 3-MA-PDT increased the rate of early and late apoptosis simultaneously compared to TPPOH-X SNPs-PDT by 33.3% vs. 20.7%, respectively. Moreover, HT-29 cells treated with TPPOH-X SNPs + 3-MA without irradiation were mostly viable, as were light control cells with 84.6% and 85.8% live cells, respectively (Figure 4C). The same results were obtained for HCT116 (Figure S10C) and SW620 cells (Figure S11C) with 52.1% vs. 33.8% and 37.8% vs. 30.4% increases for the rate of early and late apoptosis simultaneously after TPPOH-X SNPs + 3-MA-PDT and TPPOH-X SNPs-PDT, respectively. Similarly to HT-29 cells, HCT116 and SW620 cells co-treated with 3-MA were mostly viable with 83.4% and 83.7% increases compared to 82.7% and 86.4% for light control cells, respectively.

In addition to these results, in HT-29 cells, co-treatment with 3-MA with TPPOH-X SNPs-PDT induced a significant increase in caspase-3/7 activity in a time-dependent manner (Figure 4D) and enhanced DNA fragmentation (Figure 4E) compared to TPPOH-X SNPs-PDT. Furthermore, co-treatment by 3-MA without PDT neither increased caspase-3/7 activity nor DNA fragmentation. The same results were found in HCT116 (Figure S10D,E) and SW620 (Figure S11D,E) cell lines. These data demonstrated in our study that autophagy acts as a resistance pathway of apoptosis.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

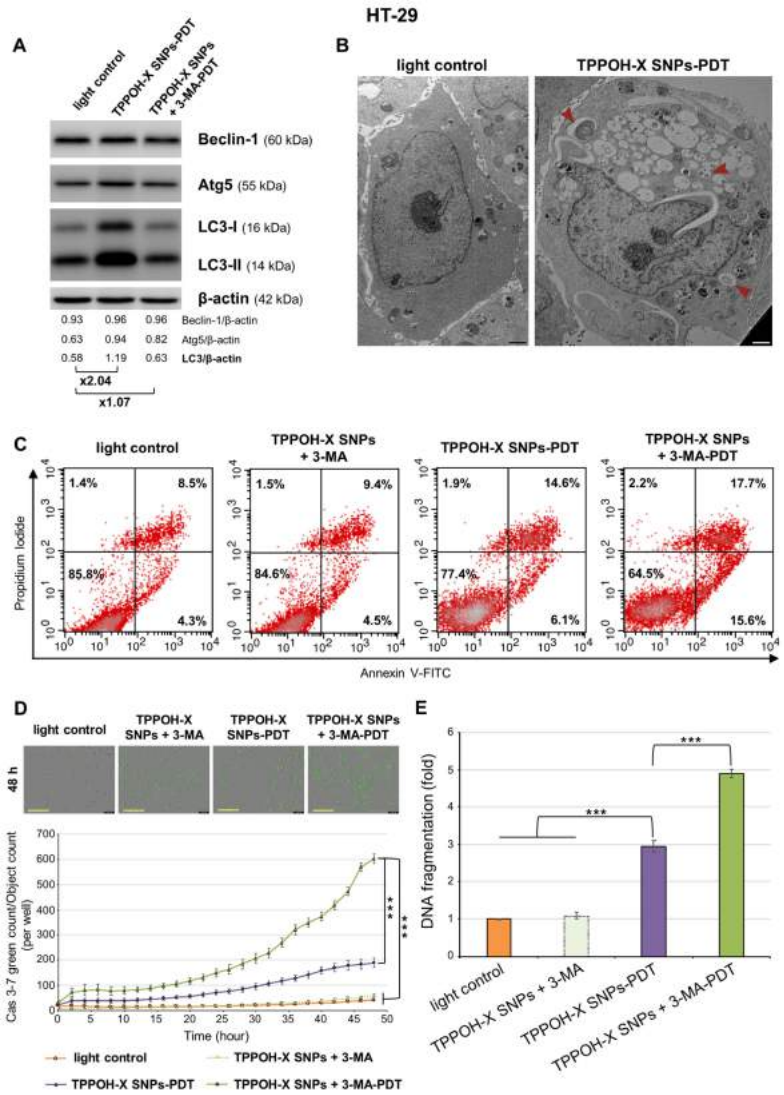


Figure 4. Effects of autophagy inhibition on HT-29 apoptosis. (**A**) HT-29 cells were treated or not with TPPOH-X SNPs in the presence or absence of 3-MA for 24 h. Expression of autophagy-related proteins was analyzed by Western blotting 48 h post-PDT. β-actin was used as a loading control. Representative images were shown. (**B**) Representative TEM images of HT-29 cells treated or not with TPPOH-X SNPs 48 h post-PDT protocol are shown. Red arrowheads indicate autophagosomes in the treated cells. Scale bar = 1 μm. (**C**) HT-29 cells were treated or not with TPPOH-X SNPs with or without 3-MA co-treatment and then were photoactivated or not photoactivated. At 48 h post-PDT, cells were stained with Annexin V-FITC and PI, and apoptosis was analyzed by flow cytometry. Upper right quadrant represents the percentage of late apoptosis, and the lower right quadrant represents early apoptosis.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

(**D**) With the same conditions of treatment, caspase-3/7 activity was evaluated each 2 h during 48 h post-PDT protocol by IncuCyte imaging live cell analysis and green count/cell count/well were shown. Representative images at 48 h post-PDT protocol were shown. Yellow scale bar = 400 μm. (**E**) With the same conditions of treatment, DNA fragmentation was quantified from cytosol extracts with ELISA. Results were reported as n-fold compared to light control. Data are shown as mean ± SEM (n = 3). *** $p < 0.001$.

2.5. SNPs Vectorization and Autophagy Inhibition Enhanced TPPOH-PDT Effects on Suppressing CRC Tumor Growth In Vivo

To test TPPOH-PDT phototoxic effects on tumor growth, we used a xenograft CRC tumor model. HT-29 cells, the most resistant cell line in our study, were injected subcutaneously into both flanks of Balb/c nude mice. When tumor volume reached 100–150 mm^3, treatments were conducted by intravenous injection, at 1/100e LD_{50} for all TPPOH groups. After 24 h incubation, one tumor from each mouse was irradiated by laser. For the TPPOH-X SNPs multi group, the same protocol was conducted every 5 days. Tumor growth was recorded every 2 days during a period of 20 days (Figure 5A). In the control group, tumors exhibited rapid growth after seeding and no significant difference in tumor volume between light and non-light tumors was detected. This result indicated that light protocol did not suppressed tumorigenicity in vivo. However, TPPOH-PDT reduced tumor growth compared to TPPOH non-photoactivated treatments in all groups at the end point but with significant differences. TPPOH-PDT groups exhibited a slowing of tumor growth after approximately 2–4 days post-PDT. At the end point, free TPPOH-PDT induced a significant reduction in tumor growth by 22.5% ± 1.8% compared to free TPPOH non-PDT. TPPOH-X SNPs-PDT also induced a significant reduction of tumor growth by 37.7% ± 1.4% compared to non-photoactivated TPPOH-X SNPs. However, TPPOH-X SNPs-PDT was significantly more effective than free TPPOH-PDT. Moreover, tumor growth inhibition was significantly enhanced by 3-MA co-treatment. TPPOH-X SNPs + 3-MA-PDT significantly decreased tumor growth by 49% ± 1.7% vs. TPPOH-X SNPs + 3-MA non-PDT. However, TPPOH-X SNPs + 3-MA-PDT was significantly more efficient than TPPOH-X SNPs-PDT, with a significant reduction in tumor growth by 19.9% ± 0.3% compared to TPPOH-X SNPs-PDT. In addition, multi TPPOH-X SNPs-PDT were also efficient, with a significant reduction in tumor growth by 54.5% ± 3.2% vs. non-photoactivated multi TPPOH-X SNPs. Unfortunately, multi TPPOH-X SNPs-PDT did not induce the slowing of tumor growth but instead significantly increased tumor growth inhibition by 22.1% ± 1.3% compared to mono TPPOH-X SNPs treatment. Mouse body weight showed no significant difference between groups over the course of treatment (Figure S12A) indicating no systemic toxicity of free TPPOH or TPPOH-X SNPs. Mice were then sacrificed, and tumors were collected, recorded, and weighed. Tumor weights were consistent with tumor volumes. The tumor weight of TPPOH-PDT groups was in each case significantly decreased compared to the control or non-photoactivated TPPOH tumor groups (Figure S12B). These results were in agreement with the representative images showed for mouse and ex-vivo tumors from each group at the end point (Figure 5B).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

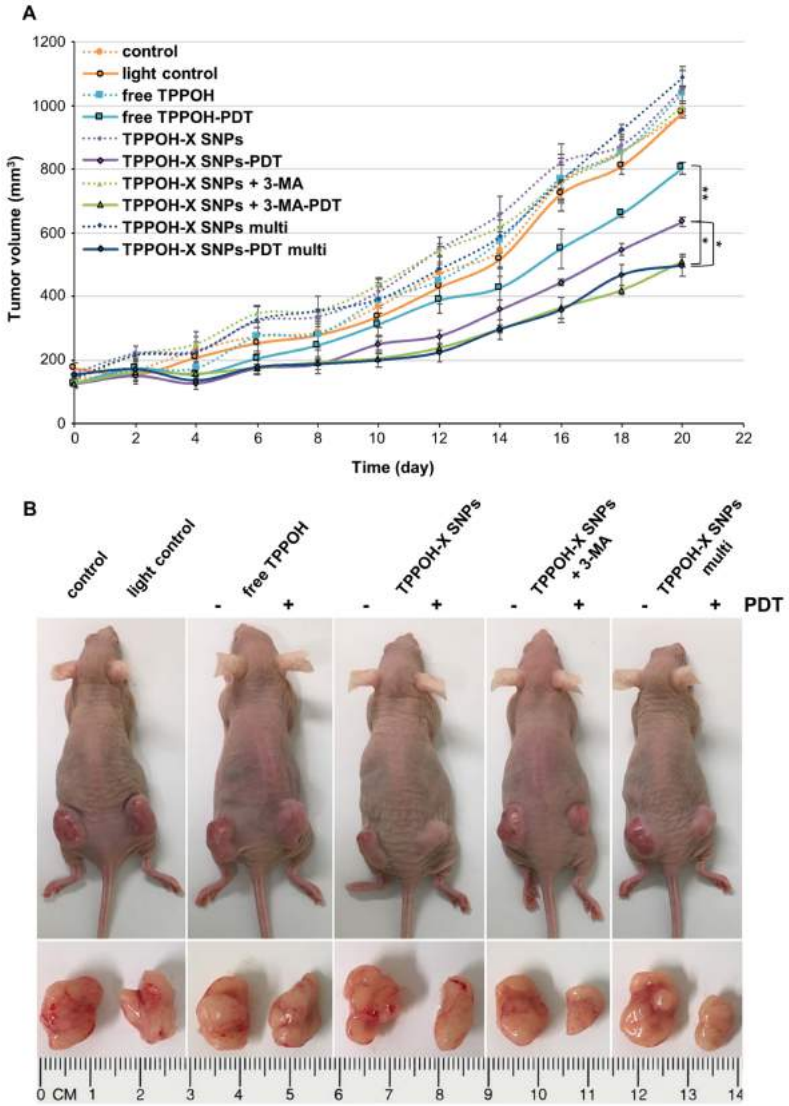


Figure 5. In vivo phototoxic effects on tumor growth. (**A**) Tumor growth curves of different groups over the treatment period until mouse sacrifice. (**B**) Representative images of HT-29 tumor-bearing nude mice and ex-vivo tumors after the mice being sacrificed on day 20. Data are shown as mean ± SEM ($n = 5$). * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$.

2.6. TPPOH-X SNPs-PDT Induced Apoptosis In Vivo

To estimate in vivo antitumor efficacy, histological analyses of tumors were performed 24 h post-PDT. One mouse from each group was sacrificed to determine the mechanism of cell death induced by our treatments. HES staining showed decreased cell density and increased tumor fibrosis

Licence CC BY-NC-ND 3.0

after TPPOH-PDT, especially after TPPOH-X SNPs-PDT with or without 3-MA, which are evidence of tissue injury caused by oxidative damage (Figure 6A). Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL)staining to assess the number of apoptotic cells, revealed apoptosis in tumors harvested from mice exposed to TPPOH-PDT. TPPOH-X SNPs-PDT with or without 3-MA induced the highest levels of apoptosis in tumors compared to free TPPOH-PDT which exhibited weak staining, indicating slight apoptosis. LC3 staining revealed 3-MA co-treatment efficacy, with a decrease in LC3 staining after TPPOH-X SNPs + 3-MA-PDT compared to TPPOH-PDT without 3-MA. According to precedent in vitro results, TPPOH-X SNPs + 3-MA-PDT induced the best antitumor response, revealed by strong levels of apoptosis in tumors compared to all TPPOH-PDT. Moreover, the comparison of PDT and non-PDT tumors, where almost all tumor cells were viable, validated the importance of laser irradiation as a trigger of apoptosis.

At the end point, histological analyses of tumors were also performed. Consistent with the early HES staining, TPPOH-PDT induced a decrease in cell density and an increase in tumor fibrosis especially in TPPOH-X SNPs + 3-MA-PDT and multi TPPOH-X SNPs-PDT groups (Figure 6B). Ki-67 staining, a nuclear cell proliferation marker, showed that the number of cancer cells with a positively stained nucleus was markedly decreased after TPPOH-PDT compared to the control or non-PDT tumor groups. Consistent with the tumor growth results, SNPs vectorization of TPPOH showed a larger decrease in Ki-67 staining compared to the free TPPOH group. In addition, autophagy inhibition or multi TPPOH-X SNPs-PDT showed a marked decrease in Ki-67 staining compared to mono TPPOH-X SNPs-PDT. All these results demonstrating increased apoptosis and cell proliferation inhibition after TPPOH-PDT confirmed the in vivo antitumor efficacy of TPPOH-X SNPs.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

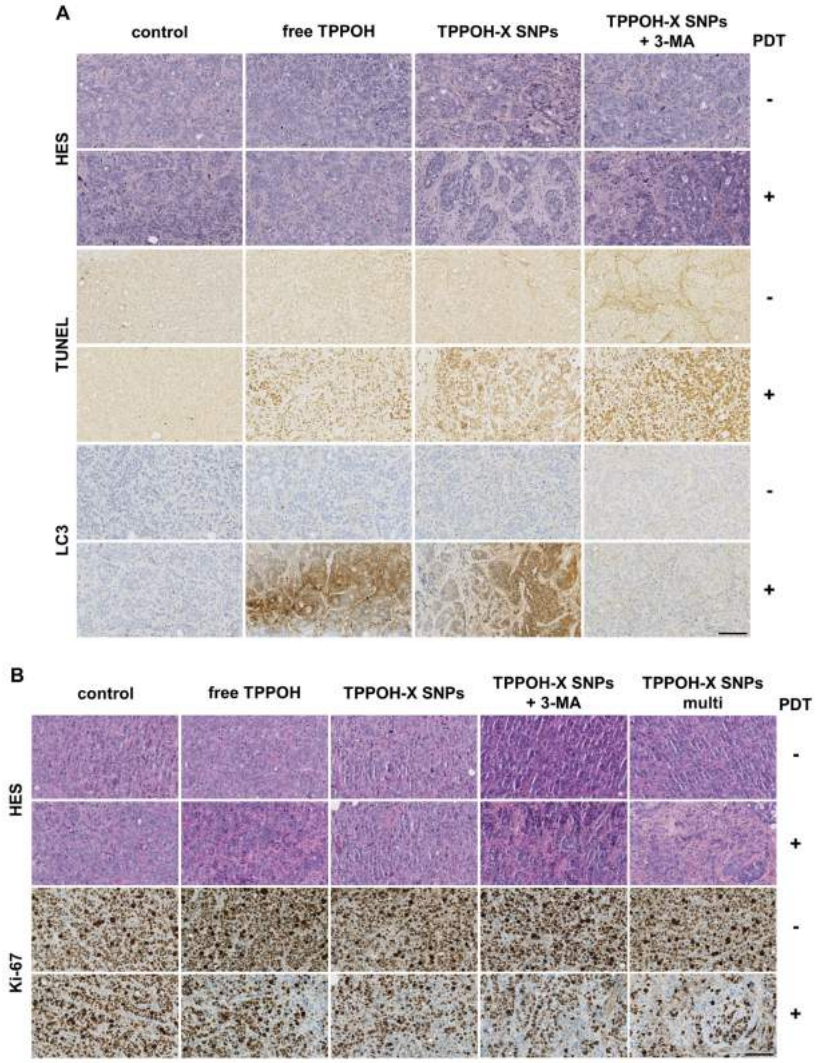


Figure 6. In vivo antitumor efficacy. (**A**) Tumors sections from treatment groups at 24 h post-PDT were stained with hematoxylin/eosin/saffron (HES), terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling (TUNEL) or LC3 staining. (**B**) Tumors sections from treatment groups after sacrifice were stained with HES and Ki-67. Representative images of each condition are shown. Black scale bar = 100 μm.

2.7. SNPs Vectorization Enhanced Tumor-Targeting without Systemic Toxicity

In comparison with free drugs, tumor-specific accumulation through the EPR effect is a key characteristic of nano-scale drugs. Therefore, we explored the biodistribution of TPPOH-X SNPs in our HT-29 cell xenograft tumor model using the IVIS Lumina quantitative fluorescence imaging system.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Cy5.5-labeled free TPPOH and TPPOH-X SNPs were administered intravenously at 1/100e LD_{50} for each group. As shown in Figure 7A, a strong TPPOH-X SNPs fluorescence signal was observed at tumor sites 24 h post injection. In contrast, free TPPOH displayed minimal accumulation at tumor sites and had a highly diffuse fluorescence pattern. To further verify the tumor-specific accumulation properties of TPPOH-X SNPs, ex-vivo fluorescence imaging of tumors and major organs was performed at 24 h post-injection (Figure 7B). In both cases, liver and kidney fluorescence intensities were higher than other organs or tumors. However, tumor fluorescence intensity of TPPOH-X SNPs was higher compared to other organs than that of free TPPOH. These observations were confirmed by quantitative ROI analysis (Figure 7C) which demonstrated that TPPOH-X SNPs displayed significantly better tumor-targeting than free TPPOH.

To evaluate the potential systemic toxicity of our drug delivery system, sections of the major organs were stained with HES. In each case, including the TPPOH-X SNPs multi group, no damage was detected compared to the control group (Figure 7D). Pathological observations of SNPs treatments did not reveal significant differences, especially for hepatic inflammation or regeneration and renal impairment. These results highlighted the efficacy of TPPOH-X SNPs as having no toxic effects on the liver and kidneys, despite the high accumulation of SNPs on these organs at this dose.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

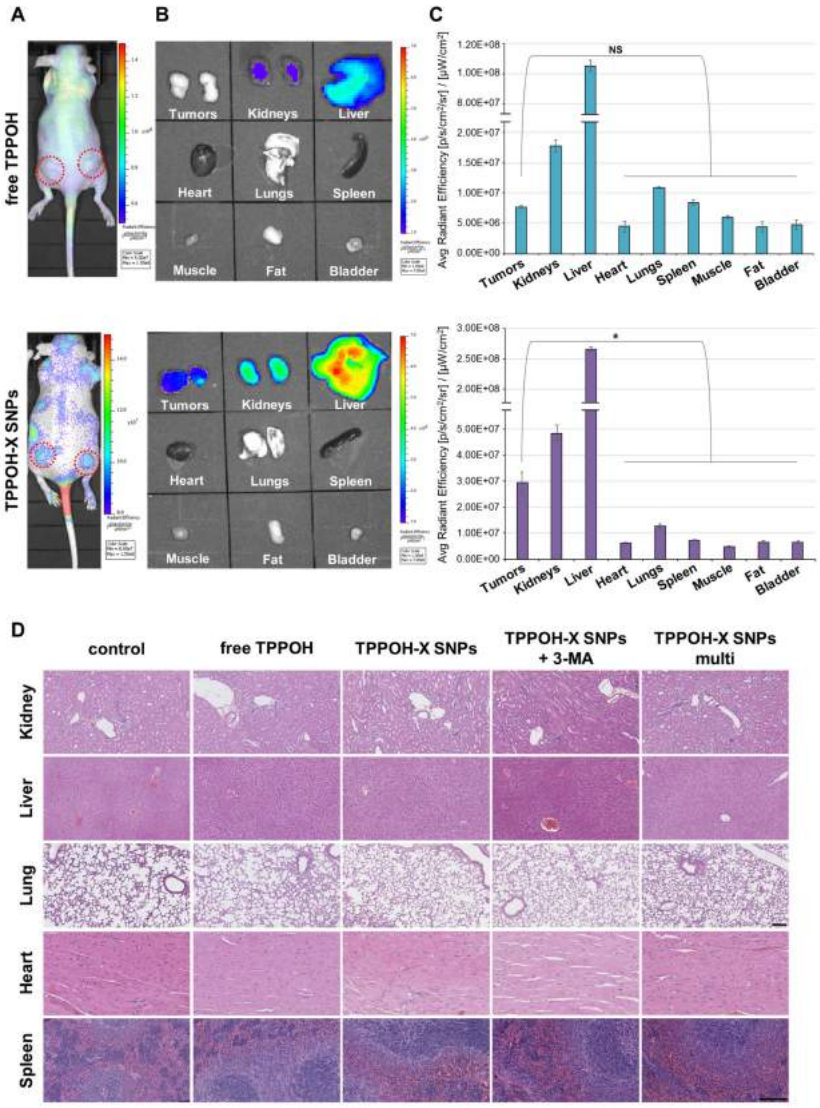


Figure 7. In vivo and ex vivo fluorescence imaging for biodistribution and safety evaluation. (**A**) In vivo fluorescence imaging of HT-29 tumor-bearing mice at 24 h post-intravenous injection of Cy5.5-labeled free TPPOH and TPPOH-X SNPs, at 1/100^{e} LD_{50} for each group. The red circles indicate tumor sites. (**B**) Ex-vivo fluorescence imaging of tumors and organs at 24 h post-injection. (**C**) ROI analysis of fluorescence intensity of tumors and organs at 24 h post-injection. (**D**) Representative images of histological analyses of major organ (kidney, liver, lung, heart and spleen) sections by HES staining. Black scale bar = 100 µm. Data are shown as mean ± SEM (n = 3). * $p < 0.05$ and NS: not significant.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

3. Discussion

To increase the delivery of hydrophobic porphyrins to target sites, nanotechnology using nanocarriers appears to be the most promising strategy. NPs vectorization through encapsulation or attachment of PS not only enhances tumor-targeting through the EPR effect, but also increases PS hydrophilicity and tissue lifetime. Roy et al. entrapped the 2-devinyl-2-(1-hexyloxyethyl) pyropheophorbide (HPPH) into SNPs [34]. They reported efficient uptake, therefore significant cell death, after light irradiation compared to free drug in ovarian and cervical cancer cell lines. Secret et al. demonstrated similar results using anionic porphyrin-grafted porous silicon nanoparticles in breast cancer cells [35]. Other studies using chlorins as PS reported enhanced uptake using Chlorin e6 (Ce6) SNPs compared to Ce6 free carrier and also a stronger decrease in cell viability after Ce6 SNPs PDT compared to Ce6 alone in glioblastoma cancer cells [36] and breast cancer cells [37]. In addition, Brezániová et al. demonstrated that temoporfin SNPs enhanced uptake and cell death in breast cancer cells but also in MDA-MB-231 tumor bearing mice. They reported efficient antitumor responses using SNPs vectorization of temoporfin compared to free drug usage due to better tumor targeting through the EPR effect [38]. Furthermore, Simon et al. highlighted that protoporphyrin IX (PpIX) SNPs have better uptake and significantly enhanced cell death compared to free PpIX, which was confirmed by a strong fluorescence signal of ROS in HCT116 and HT-29 CRC cell lines. They reported that PpIX SNPs resulted in better tumor accumulation in HCT116 tumor bearing mice than the control alone, highlighting a greater selectivity for tumor tissues with SNPs vectorization [39]. Moreover, xylan could probably play an important role in controlled drug release. Sauraj et al. reported increased anticancer efficacy of xylan-stearic acid/5-fluorouracil NPs [40] and xylan-curcumin NPs [41] in HT-29 and HCT-15 CRC cell lines compared to free drugs. Xylan appears to be an efficient system for the delivery of hydrophobic anticancer drugs in cancer therapy. In our study, we compared the interest of TPPOH-X SNPs compared to free TPPOH. We demonstrated very significant phototoxic effects of TPPOH-X SNPs mediated by ROS generation post-PDT compared to free TPPOH in CRC cell lines. This improvement in anticancer activity shown by the decreased IC_{50} dose after SNPs vectorization was due to efficient cell uptake compared to free carrier TPPOH. In vivo, we improved antitumor efficacy using TPPOH-X SNPs-PDT compared to free TPPOH due to better tumor targeting through the EPR effect, as shown by increased accumulation of TPPOH-X SNPs in tumors compared to free TPPOH. These findings demonstrated a strong interest in SNPs vectorization for hydrophobic drug delivery in vitro and mainly in vivo with efficient tumor targeting.

The major issues of inorganic SNPs are biosafety and toxicity. SNPs are one of the most biocompatible materials. However, diverse results have been reported about the safety of SNPs. The adverse effect depends on cell type and NPs size. Liu et al. demonstrated that 20 nm SNPs significantly induced apoptosis in a dose dependent manner from 100 μg/mL in human umbilical vein endothelial cells [42]. In contrast, Sergent et al. reported no cytotoxicity for 25 nm SNPs and limited cytotoxicity for 100 nm SNPs in HT-29 cells [43]. Cho et al. investigated the effect of the particle size on tissue distribution and tissue injury in vivo. They showed an accumulation in liver and spleen for 50 nm, 100 nm, and 200 nm SNPs, and observed a hepatic inflammatory response after injection of 100 and 200 nm SNPs. However, this effect was not reported for the smaller particles [44]. Moreover, Kumar et al. reported that 20 nm SNPs accumulated in all organs without signs of organ toxicity [45]. Although NPs size is important, the predominant issue is the dose injected. Chan et al. found no toxic effect in vivo after 150 nm SNPs intravenous injection up to 300 mg/kg [46]. Liu et al. demonstrated no side effects in vivo after up to 500 mg/kg of 110 nm SNPs intravenously. Repeated doses of 20, 40, and 80 mg/kg by continuous intravenous administration for 14 days have shown no toxicity. Nevertheless, for single dose toxicity, the LD_{50} was higher than 1 g/kg [47]. In our study, we did not detect any cytotoxicity for our 80 nm SNPs in HT-29 cells up to 175 μg/mL and in HCT116 and SW620 cell lines up to 35 μg/mL. We also explored the effect of 80 nm SNPs on apoptosis. Administration of 80 nm SNPs did not induce apoptosis in CRC cell lines and CRC cells exhibited normal morphology with intact cellular structures and undamaged nuclei on TEM (data not shown).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

In vivo, we did not observe any toxicity of mono or multi intravenous administration of SNPs at 270 mg/kg. SNPs accumulated especially in the liver and kidneys but with no signs of hepatic inflammation or renal impairment (data not shown). These results attest to the low toxicity of SNPs in vitro and in vivo when intravenous injection at single dose or repeated administrations.

The mode of cellular photodamage that occurs after PDT often involves death pathways such as necrosis or apoptosis. Necrosis is generally accompanied by a loss of membrane integrity and metabolic homeostasis due to uncontrolled and immediate cellular disintegration. This death pathway is associated with characteristic morphologic changes including cell swelling and membrane rupture. In general, necrosis may occur in cells when high fluence and PS concentrations are being applied [48]. Cell death described after PDT is usually through apoptosis. Apoptosis involves controlled cell destruction and packaging of cell components in apoptotic bodies, which can be phagocytized. Apoptosis is characterized morphologically by cell shrinkage and other distinctive changes such as nuclear chromatin condensation, fragmentation of the nucleus, and segregation of the cell into apoptotic bodies [49]. ROS generated either in mitochondria or in the cytoplasm have been shown to be a potent inducer of apoptosis. PDT-induced ROS-generation triggers mitochondrial pore-opening leading to caspase activation and thus induces apoptotic cell death [50,51]. Some authors have shown that tetraphenylporphyrin (TPP) derivatives triggered PDT-induced apoptosis. Costa et al. reported that 5,10,15,20-Tetra (quinolin-2-yl) porphyrin (2-TQP) decreased cell viability after PDT in HT-29 CRC cells [52]. Baldea et al. demonstrated the meso-5,10,15,20-tetrakis (4-hydroxyphenyl) porphyrin (THOPP) induced apoptosis through caspase activation after PDT [53]. Liao et al. reported TPP derivatives possessing piperidine groups induced cell death after PDT in the QBC-939 cholangiocarcinoma cell line and antitumor efficacy in QBC-939 tumor-bearing mice [54]. Roby et al. described TPP free and TPP-loaded PEG-PE micelles induced apoptosis in murine Lewis lung carcinoma [55]. Wu et al. highlighted apoptosis induction after PDT using POCL treatment composed in part of TPP in HeLa cervical cancer cells or HeLa tumor-bearing mice [56]. In our study, we demonstrated that TPPOH-X SNPs-PDT induced in vitro and in vivo cell death through the apoptosis pathway due to ROS generation in CRC cell lines. We have shown that TPPOH-X SNPs-PDT triggered mitochondrial pore-opening by the increase in JC-1 monomer rates. We highlighted apoptosis was due to caspase-3/7 involvement leading to DNA fragmentation. In addition, we demonstrated by TEM that CRC cells exhibited morphological features such as cell membrane shrinkage, nuclear condensation and formation of phagocytic vesicles or apoptotic bodies, hallmark events of apoptosis. We also reported that TPPOH-X SNPs induced apoptosis in our HT-29 tumor-bearing mice, as shown by the TUNEL assay.

Numerous studies have indicated that autophagy is activated after PDT as a result of ROS generation. Autophagy is an essential physiological process that functions to maintain cell homeostasis by removing dysfunctional or impaired cellular components and organelles [57]. There are some controversies regarding autophagy functions: autophagy plays a critical role both in programmed cell death and in survival processes. Several reports have demonstrated that PDT-induced autophagy significantly improved cytoprotective effects. Xue et al. showed that Ce6-mediated PDT induced significant apoptosis and autophagy, as indicated by the increased expression of cleaved caspase-3 and enhanced conversion of LC3-I/II forms. Autophagy inhibition by the pharmacological inhibitor: 3-MA, markedly increased PDT-induced cell death in SW620 cells [58]. Xiong et al. demonstrated the same results with also an increased number of autophagic vacuoles using Photosan-mediated PDT in HCT116 and SW620 cells. Combined treatment with the autophagy inhibitor: chloroquine, aggravated apoptosis. This combined strategy also resulted in a greater killing effect in a xenograft model, in which tumor volume decreased faster in the combined group than in the group treated with PDT alone [59]. Wei et al. reported same data in vitro and in vivo using PpIX-mediated PDT and autophagy pharmacological inhibitors or Atg5 depletion in CRC cells [60]. However, autophagy can also act as a pro-death process. Some studies showed that applying an autophagy inhibitor significantly decreased cytotoxicity and apoptosis in osteosarcoma cells [61] or in breast cancer cells [62] treated with PDT. In our

Licence CC BY-NC-ND 3.0

study, autophagy was involved after TPPOH-X SNPs-PDT in vitro as shown by the overexpression of autophagy-related proteins (Beclin-1, Atg5 and LC3) and the increased number of autophagic vacuoles. Autophagy is also enhanced in vivo as shown by the increased LC3 immunohistochemistry staining. Pharmacological autophagy inhibition by 3-MA markedly increased PDT-induced cell death in CRC cell lines. Moreover, in vivo autophagy inhibition induced a significant decrease in tumor volume compared to TPPOH-X SNPs-PDT without 3-MA co-treatment. Taken together, these findings suggest that PDT-stimulated autophagy acts as a PDT-resistance mechanism in our CRC model.

4. Materials and Methods

4.1. Materials

DMEM medium, DMEM red-phenol-free medium, RPMI 1640 medium, RPMI 1640 red-phenol-free medium, fetal bovine serum (FBS), L-glutamine and penicillin-streptomycin were purchased from Gibco BRL (Cergy-Pontoise, France). 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), N-acetyl-L-cysteine (NAC), 3-methyladenine (3-MA), anti-β-actin antibody, 5,5′,6,6′-tetrachloro-1,1′,3,3′-tetraethylbenzimidazolocarbocyanine iodide (JC-1) and cell death detection enzyme-linked immunosorbent assay^{PLUS} (ELISA) were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Beclin-1, Atg5 and LC3 antibodies were acquired from Cell Signaling Technology—Ozyme (Saint-Quentin-en-Yvelines). 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate (DCFDA) cellular ROS detection assay kit and goat anti-rabbit IgG H&L horseradish peroxidase (HRP) secondary antibody were purchased from Abcam (Paris, France). LysoTracker, MitoTracker, rabbit anti-mouse IgG-IgM H&L HRP secondary antibody, TO-PRO-3, annexin V-FITC and propidium iodide (PI) were obtained from Invitrogen—Thermo Fisher Scientific (Villebon-sur-Yvette, France). Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate was acquired from Merck (Lyon, France). Caspase-3/7 green reagent was purchased from Sartorius (Göttingen, Germany).

4.2. Synthesis of Free TPPOH and TPPOH-X SNPs

The synthesis and characterization of free TPPOH and TPPOH-X SNPs were recently published by our research team [29]. SNPs were synthesized with an 80 nm average diameter following the modified Stöber method. Free TPPOH was synthesized and was conjugated with xylan via an esterification reaction forming TPPOH-X which was used in the surface modification of SNPs. The presence of glucuronic acid groups on xylan results in the formation of ionic bonds on the surface of SNPs which is made cationic by (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES). SNPs vectorization did not induced changes in the TPPOH spectrum (supplementary data [29]). Stock solutions of free TPPOH (5 mg/mL) and TPPOH-X SNPs (20 mg/mL) were prepared in ethanol.

4.3. Cell Culture

Human CRC cell lines (HT-29, HCT116 and SW620) were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC—LGC Standards, Molsheim, France). Cells were grown in DMEM medium for HT-29 cells and RPMI 1640 medium for HCT116 and SW620 cells. Cells were supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine and 100 U/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin. Cultures were maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO_2 at 37 °C. For all experiments, cells were seeded at 2.1 $\times 10^4$, 1.2 $\times 10^4$ and 1.5 $\times 10^4$ cells/cm^2 for HT-29, HCT116 and SW620 cells respectively and culture medium was replaced by red phenol-free appropriate culture medium before PDT. Stock solutions of free TPPOH and TPPOH-X SNPs were diluted in culture medium to obtain the appropriate final concentrations. The same amount of vehicle (percentage of ethanol did not exceed 0.6%) was added to control cells.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

4.4. In Vitro Phototoxicity of TPPOH-PDT

Phototoxicity was determined using MTT assay. Cells were seeded in 96-well culture plates and grown for 24 h in appropriate culture medium prior to exposure or not to TPPOH or SNPs. After 24 h incubation, cells were irradiated or not with 630–660 nm CURElight lamp at 75 J/cm^2 (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). MTT assay were performed 48 h after irradiation and cell viability was expressed as a percentage of each treatment condition by normalizing to untreated cells.

4.5. Intracellular ROS Generation by TPPOH-PDT

ROS generation was quantified using a cellular reactive oxygen species detection assay which uses the cell permeant reagent DCFDA. Cells were seeded in 6-well culture plates and were grown for 24 h prior to exposure or not to TPPOH at respective IC_{50} values. After 24 h incubation, cells were stained with DCFDA for 30 min at 37 °C. After washing, cells were irradiated or not. To confirm ROS inhibition, cells were pretreated with ROS scavenger NAC 1 h before PDT at 10 mM. ROS generation was examined by flow cytometry 4 h post-PDT. Tert-Butyl Hydrogen Peroxide (TBHP) was used as a positive control at 250 μM.

4.6. TPPOH Cellular Uptake and Localization

Cells were seeded in 6-well culture plates and were grown for 24 h prior to exposure to free TPPOH or TPPOH-X SNPs at the same concentration (1 μM TPPOH). After 24 h incubation, TPPOH fluorescence (excitation/emission: 405/650 nm) was determined by AMNIS® imaging flow cytometry analysis and studied with IDEAS software (Merck). To determine TPPOH-X SNPs localizations, cells were seeded and treated as described above and co-treated at 37 °C with 75 nM LysoTracker during 2 h or 150 nM MitoTracker during 45 min. TPPOH-X SNPs localizations were determined by AMNIS® imaging flow cytometry and studied with IDEAS software using TPPOH fluorescence (excitation/emission: 405/650 nm) with LysoTracker fluorescence (excitation/emission: 578/603 nm) or MitoTracker fluorescence (excitation/emission: 490/516 nm). The same protocol was conducted for confocal microscopy analysis and photos were taken with a confocal microscope (laser Zeiss LSM 510 Meta—×1000)

4.7. Transmission Electron Microscopy (TEM)

Cells were seeded in 6-well culture plates and were grown for 24 h prior to exposure or not to TPPOH-X SNPs treatment. After 24 h of incubation, cells were recovered for uptake experiment. For apoptosis and autophagy experiments, cells were irradiated or not. 48 h post-PDT protocol or immediately after 24 h of incubation for uptake experiment, cells were then incubated in 1% osmium tetroxide solution for 30 min at room temperature, dehydrated with increasing ethanol concentrations, and embedded in epon. Cells were polymerized over 48 h at 60 °C and ultrathin sections (80–100 nm) were prepared. Grids were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with TEM JEM-1011 (JEOL, Croissy-sur-Seine, France) operated at 80 KeV.

4.8. Autophagy Detection and Inhibition

Cells were seeded in 25 cm^2 tissue culture flasks and were grown for 24 h prior to exposure or not to TPPOH-X SNPs at the IC_{50} value. After 24 h incubation, cells were treated or not with the autophagy pharmacological inhibitor: 3-MA at 2 mM and were irradiated. 48 h post-PDT, cells were recovered and lysed in RIPA lysis buffer. Protein levels were determined using the Bradford method. Western blotting was performed on autophagy-related proteins, anti-Beclin-1 (1:1000), anti-Atg5 (1:1000) and anti-LC3 (1:1000). Anti-β-actin (1:5000) was used as a loading control. After incubation with the appropriate secondary antibodies, blots were developed using the Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate and G:BOX system (Syngene, Cambridge, UK).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

4.9. In Vitro Apoptosis by TPPOH-X SNPs

Cells were seeded in 25 cm^2 tissue culture flasks and were grown for 24 h prior to exposure or not to TPPOH-X SNPs at the IC_{50} value. After 24 h incubation, cells were treated or not with 3-MA and were irradiated. Cells were recovered 48 h post-PDT and divided in three groups. The first group was used to estimate mitochondrial membrane potential using JC-1. Cells were treated with JC-1 (1 μg/mL) for 30 min at 37 °C and then with TO-PRO-3 (1 μM) and mitochondrial membrane potential was immediately evaluated by flow cytometry. The second group of cells was used to determine apoptosis by dual staining with Annexin V-FITC and PI. Cells were treated with Annexin V-FITC and PI (1.5 μM) for 15 min at room temperature and cell viability was determined by flow cytometry. The last group was used to assess DNA fragmentation. Histone release from the nucleus during apoptosis was analyzed using the Cell Death Detection ELISA^{PLUS} as previously described [63]. Cytosol extracts were obtained according to the manufacturer's protocol. DNA fragmentation was measured and results were reported as n-fold compared to control.

Cells were seeded in 96-well culture plates and were grown for 24 h prior to exposure or not to TPPOH-X SNPs at the IC_{50} value. After 24 h incubation, cells were treated or not with 3-MA and were irradiated. Then, cells were treated with caspase-3/7 green reagent (5 μM) and were placed in the IncuCyte S3 live cell analysis system (Sartorius). Cells were imaged every 2 h with 4 images/well in phase contrast and green fluorescence modes using a ×10 objective to detect apoptotic cells. Apoptotic level was quantified by the IncuCyte software (Sartorius) as caspase-3/7 green count/cell count/well.

4.10. Heterotopic CRC Model

To establish a subcutaneous xenograft model of human CRC, human CRC HT-29 cells (5×10^6 cells in 100 μL of 50/50 PBS-matrigel) were subcutaneously injected in each side of the dorsal region of four-week-old female Balb/c nude mice (≈20 g). At these sites, the tumors were easily accessible for treatment and assessment of response. We measured tumor dimensions every other day by a caliper and calculated the volume with the formula ($V = 4\pi/3 \times LW^2/8$, where L is tumor length and W is tumor width) [64].

4.11. In Vivo Antitumor Efficacy and Biosafety Evaluation of TPPOH-PDT

To confirm antitumor efficacy, HT-29 tumor-bearing mice were established as described above and anticancer treatments were administered when the tumors were approximately 100–150 mm^3. Mice were randomly divided into five groups ($n = 6$): control, free TPPOH, TPPOH-X SNPs, TPPOH-X SNPs + 3-MA and TPPOH-X SNPs multi. Mice were injected in the tail vein with 100 μL phosphate buffered saline (PBS) or $1/100^e$ lethal dose 50 (LD_{50}) ($\text{Log } LD_{50} = 0.435 \log IC_{50}$ (mM) + 0.625) [65] for all TPPOH groups: free TPPOH (3.26 mg/kg), TPPOH-X SNPs with or without 3-MA and multi group (1.16 mg/kg TPPOH and 334 mg/kg SNPs). Mice from the TPPOH-X SNPs + 3-MA group received a 100 μL IP injection of 24 mg/kg 3-MA [66]. Then, 24 h post-injection, only one tumor per mouse was subjected to light irradiation to compare intra-individual irradiation effects. Consequently, 10 conditions were studied: each of the 5 groups was divided in 2 conditions (no irradiation: PDT—and red irradiation: PDT +). Irradiation was performed with a 660 nm red laser (Z-LASER, Freiburg, Germany). PDT was performed by 2 sequences of 5 min irradiation separated by 5 min (at 660 nm with 100 mW, for a 200 J/cm^2 fluence as previously described [67]. For the TPPOH-X SNPs multi group, the same protocol was conducted every 5 days. At 24 h post-PDT, one mouse from each group except for the TPPOH-X SNPs multi group was sacrificed and tumors were harvested and fixed in 4% paraformaldehyde to prepare paraffin sections. Hematoxylin/eosin/saffron (HES) staining was used for histological analyses, while TUNEL assay and LC3 staining were performed to assess apoptosis and autophagy levels in the tumors, respectively. For other mice, tumor size and mouse body weight were recorded every 2 days. HT-29 tumor-bearing mice were sacrificed on day 20 after initial drug treatment and tumor weight was

Licence CC BY-NC-ND 3.0

recorded. Tumors and major organs including kidneys, liver, lungs, heart and spleen were harvested and fixed in 4% paraformaldehyde to prepare paraffin sections. HES staining was used for histological analysis and Ki-67 staining was used to assess tumor cell proliferation and growth. HES staining was performed with Tissue Tek (Sakura, Alphen aan den Rijn, Netherlands), Ki-67 staining with BenchMark Ultra Ventana (Roche Diagnostics, Meylan, France), TUNEL assay with the cell death detection kit POD (Roche Diagnostics) and LC3 staining with LC3 antibody (1:200) and revealed with Acuity Advanced Biotin Free Polymer Detection System DAB (BioLegend, London, UK). All histological analyses were scanned under the NanoZoomer RS2 optical microscope scanner (Hamamatsu Photonics, Massy, France) and studied with NDPView software.

4.12. In Vivo Biodistribution of TPPOH-X SNPs

To determine the biodistribution of TPPOH treatments, free TPPOH and TPPOH-X SNPs were labeled with Cyanine 5.5 (Lumiprobe, Hannover, Germany) to allow tracking because the TPPOH emission spectrum overlaps with that of blood. HT-29 tumor-bearing mice, established as described above, were randomly divided into two groups ($n = 3$) and intravenously injected with $1/100^{e}$ LD_{50} for both group: Cy5.5-free TPPOH (3.26 mg/kg) and Cy5.5-TPPOH-X SNPs (1.16 mg/kg TPPOH and 334 mg/kg SNPs). Then 24 h post-injection, the biodistribution was determined using IVIS Lumina quantitative fluorescence imaging system (PerkinElmer, Villepinte, France). Subsequently, the mice were sacrificed and ex vivo biodistribution images of the tumors and major organs were immediately taken. Relative signal intensity in tumors and organs was calculated, using Living Image software (PerkinElmer), as radiant efficiency ([photons/s/cm^2/sr]/[μW/cm^2]) per pixel of the region of interest (ROI), which was drawn around the respective organ.

4.13. Ethical Statement

Institutional review board approval was obtained from the Regional Animal Experimentation Ethics Committee (approval number: #16335-2018073009499570 v3). All animal experiments and experimental protocols were in accordance with the recommendations of the European Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU) on the protection of animals used for scientific purposes. All efforts were made to reduce the number of animals used and to ensure their optimal conditions of well-being before, during, and after each experiment.

4.14. Statistical Analysis

All quantitative results are expressed as the mean ± standard error of the mean (SEM) of separate experiments. Statistical significance was evaluated by the two-tailed unpaired Student's t-test and expressed as: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

5. Conclusions

In this study, we evaluated for the first time the anticancer efficacy of the new TPPOH-X SNPs synthesized by our research team in human CRC cell lines and on HT-29 tumor-bearing mice. According to our hypothesis concerning the interest of SNPs vectorization, we demonstrated the strong anticancer efficacy of TPPOH in vitro and in vivo, and the additional benefit of vectorized SNPs. As shown by the strong antitumor efficacy on HT-29 tumor-bearing mice with both multi TPPOH-X SNPs-PDT or co-treatment with an autophagy inhibitor, our new TPPOH-X SNPs seem to be a promising PDT agent for further clinical protocols.

Supplementary Materials: The following are available online at http://www.mdpi.com/2072-6694/11/10/1474/s1, Figure S1: In vitro phototoxic effects of TPPOH-X SNPs-PDT and ROS production in HCT116 cells, Figure S2: In vitro phototoxic effects of TPPOH-X SNPs-PDT and ROS production in SW620 cells, Figure S3: Cell uptake of TPPOH-X SNPs by HCT116 cells, Figure S4: Cell uptake of TPPOH-X SNPs by SW620 cells, Figure S5: TPPOH-X SNPs localization in HT-29 cells, Figure S6: TPPOH-X SNPs localization in HCT116 cells, Figure S7: TPPOH-X SNPs localization in SW620 cells, Figure S8: Effects of TPPOH-X SNPs-PDT on HCT116 cell line apoptosis,

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Figure S9: Effects of TPPOH-X SNPs-PDT on SW620 cell line apoptosis, Figure S10: Effects of autophagy inhibition on HCT116 apoptosis, Figure S11: Effects of autophagy inhibition on SW620 apoptosis, Figure S12: In vivo phototoxic effects on tumor growth.

Author Contributions: S.B., F.B., V.S. and V.C. synthesized and characterized free TPPOH and TPPOH-X SNPs. L.B. performed, analyzed the experiments and wrote the paper. C.O. provided technical assistance for flow cytometry analyses shown in Figures 1–4. L.R. did TEM acquisitions shown in Figures 2–4. M.-L.P. did TUNEL assay shown in Figure 6 and provided technical assistance for in vivo biodistribution shown in Figure 7. A.C. did HES and Ki-67 staining shown in Figures 6 and 7. C.C. did confocal microscopy analysis shown in Supplementary Figures S5–S7. A.P., D.Y.L. and B.L. provided technical assistance for the experiments and corrected the paper. All authors approved the final version of the manuscript.

Funding: The expenses of this work were defrayed in part by the Ministère de l'Enseignement Supérieur, de la Recherche et de l'Innovation through the European Fund of Regional Development FEDER 2014–2020 and by the Conseil Régional Nouvelle Aquitaine.

Acknowledgments: Authors are grateful to histopathology platform (Histolim—Research Institute GEIST) of the University of Limoges especially Carine Guillot and Sandrine Robert for a major part of histopathological staining and Mathilde Duchesne for cytopathology. Authors acknowledge Mickael Meyrand and Nicolas Roy for their assistance for IncuCyte analysis. Authors also thank Alexis Desmoulière for providing histopathological supplies and Laetitia Vignaud for providing technical assistance in histopathological staining. The authors are indebted to Jeanne Cook-Moreau for help in manuscript editing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

3-MA: 3-methyladenine; APTES: (3-aminopropyl) triethoxysilane; Ce6: Chlorin e6; CRC: colorectal cancer; DCFDA: 2′,7′-dichlorofluorescein diacetate; ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay; EPR effect: enhanced permeability and retention effect; FBS: fetal bovine serum; HES: hematoxylin/eosin/saffron; HRP: horseradish peroxidase; JC-1: 5,5′,6,6′-tetrachloro-1,1′,3,3′-tetraethylbenzimidazolocarbocyanine iodide; LC3: light chain 3; LD_{50}: lethal dose 50; MTT: 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; NAC: N-acetyl-L-cysteine; NPs: nanoparticles; PBS: phosphate buffered saline; PDT: photodynamic therapy; PI: propidium iodide; Protoporphyrin IX: PpIX; PS: photosensitizer; ROI: region of interest; ROS: reactive oxygen species; SEM: standard error of the mean; SNPs: silica nanoparticles; TBHP: tert-butyl hydrogen peroxide; TEM: transmission electron microscopy; TPP: tetraphenylporphyrin; TPPOH-X: xylan-TPPOH conjugate; TPPOH: 5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin; TUNEL: terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling.

References

1. Globocan. Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2018. Information and Online Prediction. WHO International Agency for Research of Cancer. 2018. Available online: http://gco.iarc.fr/today/home (accessed on 8 July 2019).
2. Xue, L.; Williamson, A.; Gaines, S.; Andolfi, C.; Paul-Olson, T.; Neerukonda, A.; Steinhagen, E.; Smith, R.; Cannon, L.M.; Polite, B.; et al. An Update on Colorectal Cancer. *Curr. Probl. Surg.* **2018**, *5555*, 76–116. [CrossRef] [PubMed]
3. Matsuda, T.; Yamashita, K.; Hasegawa, H.; Oshikiri, T.; Hosono, M.; Higashino, N.; Yamamoto, M.; Matsuda, Y.; Kanaji, S.; Nakamura, T.; et al. Recent updates in the surgical treatment of colorectal cancer. *Ann. Gastroenterol. Surg.* **2018**, *22*, 129–136. [CrossRef]
4. Wolpin, B.M.; Mayer, R.J. Systemic Treatment of Colorectal Cancer. *Gastroenterology* **2008**, *134134*, 1296–1310. [CrossRef] [PubMed]
5. Lee, Y.T.; Tan, Y.J.; Oon, C.E. Molecular targeted therapy: Treating cancer with specificity. *Eur. J. Pharmacol.* **2018**, *834*, 188–196. [CrossRef] [PubMed]
6. Van der Jeught, K.; Xu, H.-C.; Li, Y.-J.; Lu, X.-B.; Ji, G. Drug resistance and new therapies in colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* **2018**, *2424*, 3834–3848. [CrossRef] [PubMed]
7. Kawczyk-Krupka, A.; Bugaj, A.M.; Latos, W.; Zaremba, K.; Wawrzyniec, K.; Kucharzewski, M.; Sieroń, A. Photodynamic therapy in colorectal cancer treatment-The state of the art in preclinical research. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2016**, *13*, 158–174. [CrossRef] [PubMed]
8. Kwiatkowski, S.; Knap, B.; Przystupski, D.; Saczko, J.; Kędzierska, E.; Knap-Czop, K.; Kotlińska, J.; Michel, O.; Kotowski, K.; Kulbacka, J. Photodynamic therapy–mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomed. Pharmacother.* **2018**, *106*, 1098–2107. [CrossRef]

Licence CC BY-NC-ND 3.0

9. Hamblin, M.R.; Mroz, P. *Advances in Photodynamic Therapy: Basic, Translational and Clinical*, 1st ed.; Boston, Mass, Artech House Publishers: Norwood, MA, USA, 2008.
10. Dolmans, D.E.J.G.J.; Fukumura, D.; Jain, R.K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer* **2003**, *33*, 380–387. [CrossRef] [PubMed]
11. DeRosa, M.C.; Crutchley, R.J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord. Chem. Rev.* **2002**, *233*, 351–371. [CrossRef]
12. Mroz, P.; Yaroslavsky, A.; Kharkwal, G.B.; Hamblin, M.R. Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer. *Cancers* **2011**, *33*, 2516–2539. [CrossRef]
13. Plaetzer, K.; Kiesslich, T.; Verwanger, T.; Krammer, B. The Modes of Cell Death Induced by PDT: An Overview. *Med. Laser Appl.* **2003**, *1818*, 7–19. [CrossRef]
14. Abrahamse, H.; Hamblin, M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochem. J.* **2016**, *473473*, 347–364. [CrossRef] [PubMed]
15. Saini, R.K.; Chouhan, R.; Bagri, L.P.; Bajpai, A.K. Strategies of Targeting Tumors and Cancers. *J. Cancer Res. Updates* **2012**, *1*, 129–152.
16. Huang, Y.Y.; Sharma, S.K.; Dai, T.; Chung, H.; Yaroslavsky, A.; Garcia-Diaz, M.; Chang, J.; Chiang, L.Y.; Hamblin, M.R. Can nanotechnology potentiate photodynamic therapy? *Nanotechnol. Rev.* **2012**, *11*, 111–146. [CrossRef]
17. Iyer, A.K.; Khaled, G.; Fang, J.; Maeda, H. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting. *Drug. Discov. Today* **2006**, *1111*, 812–818. [CrossRef] [PubMed]
18. Zhou, Y.; Liang, X.; Dai, Z. Porphyrin-loaded nanoparticles for cancer theranostics. *Nanoscale* **2016**, *8*, 12394–12405. [CrossRef] [PubMed]
19. Debele, T.A.; Peng, S.; Tsai, H.-C. Drug Carrier for Photodynamic Cancer Therapy. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 22094–22136. [CrossRef] [PubMed]
20. Wu, X.; Wu, M.; Xiaojun Zhao, J. Recent Development of Silica Nanoparticles as Delivery Vectors for Cancer Imaging and Therapy. *Nanomedicine* **2014**, *10*, 297–312. [CrossRef]
21. Couleaud, P.; Morosini, V.; Frochot, C.; Richeter, S.; Raehm, L.; Durand, J.-O. Silica-based nanoparticles for photodynamic therapy applications. *Nanoscale* **2010**, *2*, 1083–1095. [CrossRef] [PubMed]
22. Chen, Y.; Chen, H.; Shi, J. In Vivo Bio-Safety Evaluations and Diagnostic/Therapeutic Applications of Chemically Designed Mesoporous Silica Nanoparticles. *Adv. Mater.* **2013**, *25*, 3144–3176. [CrossRef] [PubMed]
23. Lemarchand, C.; Gref, R.; Couvreur, P. Polysaccharide-decorated nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *58*, 327–341. [CrossRef] [PubMed]
24. Gref, R. Surface-engineered nanoparticles as drug carriers. In *Synthesis, Functionalization and Surface Treatment of Nanoparticles*, 1st ed.; Baraton, M.I., Ed.; American Scientific Publishers: California, CA, USA, 2002; pp. 233–256.
25. Owens, D.E.; Peppas, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* **2006**, *307*, 93–102. [CrossRef] [PubMed]
26. Shrotri, A.; Kobayashi, H.; Fukuoka, A. Chapter Two-Catalytic Conversion of Structural Carbohydrates and Lignin to Chemicals. *Adv. Catal.* **2017**, *60*, 59–123.
27. Ma, J.; Li, D.; Zhong, L.; Du, F.; Tan, J.; Yang, J.; Peng, X. Synthesis and characterization of biofunctional quaternized xylan-Fe2O3 core/shell nanocomposites and modification with polylysine and folic acid. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *199*, 382–389. [CrossRef]
28. Daus, S.; Heinze, T. Xylan-based nanoparticles: Prodrugs for ibuprofen release. *Macromol. Biosci.* **2010**, *10*, 211–220. [CrossRef] [PubMed]
29. Bouramtane, S.; Bretin, L.; Pinon, A.; Leger, D.; Liagre, B.; Richard, L.; Brégier, F.; Sol, V.; Chaleix, V. Porphyrin-xylan-coated silica nanoparticles for anticancer photodynamic therapy. *Carbohydr. Polym.* **2019**, *213*, 168–175. [CrossRef]
30. Lai, K.; Killingsworth, M.C.; Lee, C.S. The significance of autophagy in colorectal cancer pathogenesis and implications for therapy. *J. Clin. Pathol.* **2014**, *67*, 854–858. [CrossRef]
31. Duan, X.; Chen, B.; Cui, Y.; Zhou, L.; Wu, C.; Yang, Z.; Wen, Y.; Miao, X.; Li, Q.; Xiong, L.; et al. Ready player one? Autophagy shapes resistance to photodynamic therapy in cancers. *Apoptosis* **2018**, *23*, 587–606. [CrossRef]

Licence CC BY-NC-ND 3.0

32. Hackbarth, S.; Horneffer, V.; Wiehe, A.; Hillenkamp, F.; Röder, B. Photophysical properties of pheophorbide-a-substituted diaminobutane poly-propylene-imine dendrimer. *Chem. Phys.* **2001**, *269*, 339–346. [CrossRef]
33. Li, Y.; Jang, W.D.; Nishiyama, N.; Kishimura, A.; Kawauchi, S.; Morimoto, Y.; Miake, S.; Yamashita, T.; Kikuchi, M.; Aida, T.; et al. Dendrimer Generation Effects on Photodynamic Efficacy of Dendrimer Porphyrins and Dendrimer-Loaded Supramolecular Nanocarriers. *Chem. Mater.* **2007**, *19*, 5557–5562. [CrossRef]
34. 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*, 7860–7865. [CrossRef] [PubMed]
35. Secret, E.; Maynadier, M.; Gallud, A.; Gary-Bobo, M.; Chaix, A.; Belamie, E.; Maillard, P.; Sailor, M.J.; Garcia, M.; Durand, J.O.; et al. Anionic porphyrin-grafted porous silicon nanoparticles for photodynamic therapy. *Chem. Commun. (Camb.)* **2013**, *49*, 4202–4204. [CrossRef] [PubMed]
36. Youssef, Z.; Jouan-Hureaux, V.; Colombeau, L.; Arnoux, P.; Moussaron, A.; Baros, F.; Toufaily, J.; Hamieh, T.; Roques-Carmes, T.; Frochot, C. Titania and silica nanoparticles coupled to Chlorin e6 for anti-cancer photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2018**, *22*, 115–126. [CrossRef]
37. Bharathiraja, S.; Moorthy, M.S.; Manivasagan, P.; Seo, H.; Lee, K.D.; Oh, J. Chlorin e6 conjugated silica nanoparticles for targeted and effective photodynamic therapy. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2017**, *19*, 212–220. [CrossRef] [PubMed]
38. Brezániová, I.; Záruba, K.; Králová, J.; Adámková, H.; Ulbrich, P.; Poučková, P.; Hrubý, M.; Štěpánek, P.; Král, V. Silica-based nanoparticles are efficient delivery systems for temoporfin. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2018**, *21*, 275–284.
39. Simon, V.; Devaux, C.; Darmon, A.; Donnet, T.; Thiénot, E.; Germain, M.; Honnorat, J.; Duval, A.; Pottier, A.; Borghi, E.; et al. Pp IX silica nanoparticles demonstrate differential interactions with in vitro tumor cell lines and in vivo mouse models of human cancers. *Photochem. Photobiol.* **2010**, *86*, 213–222. [CrossRef]
40. Kumar, V.; Kumar, B.; Deeba, F.; Bano, S.; Kulshreshtha, A.; Gopinath, P.; Negi, Y.S. Lipophilic 5-fluorouracil prodrug encapsulated xylan-stearic acid conjugates nanoparticles for colon cancer therapy. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *128*, 204–213.
41. Sauraj Kumar, S.U.; Kumar, V.; Priyadarshi, R.; Gopinath, P.; Negi, Y.S. pH-responsive prodrug nanoparticles based on xylan-curcumin conjugate for the efficient delivery of curcumin in cancer therapy. *Carbohydr. Polym.* **2018**, *188*, 252–259. [CrossRef]
42. Liu, X.; Sun, J. Endothelial cells dysfunction induced by silica nanoparticles through oxidative stress via JNK/P53 and NF-kB pathways. *Biomaterials* **2010**, *31*, 8198–8209. [CrossRef]
43. Sergent, J.-A.; Paget, V.; Chevillard, S. Toxicity and genotoxicity of nano-SiO_2 on human epithelial intestinal HT-29 cell line. *Ann. Occup. Hyg.* **2012**, *56*, 622–630.
44. Cho, M.; Cho, W.S.; Choi, M.; Kim, S.J.; Han, B.S.; Kim, S.H.; Kim, H.O.; Sheen, Y.Y.; Jeong, J. The impact of size on tissue distribution and elimination by single intravenous injection of silica nanoparticles. *Toxicol. Lett.* **2009**, *189*, 177–183. [CrossRef]
45. Kumar, R.; Roy, I.; Ohulchanskky, T.Y.; Vathy, L.A.; Bergey, E.J.; Sajjad, M.; Prasad, P.N. In vivo biodistribution and clearance studies using multimodal organically modified silica nanoparticles. *ACS Nano* **2010**, *4*, 699–708. [CrossRef]
46. Chan, W.T.; Liu, C.C.; Chiau, J.S.C.; Tsai, S.T.; Liang, C.K.; Cheng, M.L.; Lee, H.C.; Yeung, C.Y.; Hou, S.Y. In vivo toxicologic study of larger silica nanoparticles in mice. *Int. J. Nanomedicine* **2017**, *12*, 3421–3432. [CrossRef]
47. Liu, T.; Li, L.; Teng, X.; Huang, X.; Liu, H.; Chen, D.; Ren, J.; He, J.; Tang, F. Single and repeated dose toxicity of mesoporous hollow silica nanoparticles in intravenously exposed mice. *Biomaterials* **2011**, *32*, 1657–1668. [CrossRef]
48. Zhou, C.N. Mechanisms of tumor necrosis induced by photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B* **1989**, *3*, 299–318. [CrossRef]
49. Elmore, S. Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicol. Pathol.* **2007**, *35*, 495–516. [CrossRef] [PubMed]
50. Li, X.; Zhu, F.; Jiang, J.; Sun, C.; Wang, X.; Shen, M.; Tian, R.; Shi, C.; Xu, M.; Peng, F.; et al. Synergistic antitumor activity of withaferin A combined with oxaliplatin triggers reactive oxygen species-mediated inactivation of the PI3K/AKT pathway in human pancreatic cancer cells. *Cancer Lett.* **2015**, *357*, 219–230. [CrossRef]

Licence CC BY-NC-ND 3.0

51. Skulachev, V.P. Mitochondrial physiology and pathology; concepts of programmed death of organelles, cells and organisms. *Mol. Asp.S Med.* **1999**, *20*, 139–184. [CrossRef]
52. Costa, L.D.; de Silva, J.A.; Fonseca, S.M.; Arranja, C.T.; Urbano, A.M.; Sobral, A.J.F.N. Photophysical Characterization and in Vitro Phototoxicity Evaluation of 5,10,15,20-Tetra (quinolin-2-yl) porphyrin as a Potential Sensitizer for Photodynamic Therapy. *Molecules* **2016**, *21*, 439. [CrossRef]
53. Baldea, I.; Olteanu, D.E.; Bolfa, P.; Ion, R.M.; Decea, N.; Cenariu, M.; Banciu, M.; Sesarman, A.V.; Filip, A.G. Efficiency of photodynamic therapy on WM35 melanoma with synthetic porphyrins: Role of chemical structure, intracellular targeting and antioxidant defense. *J. Photochem. Photobiol. B* **2015**, *151*, 142–152. [CrossRef]
54. Liao, P.Y.; Gao, Y.H.; Wang, X.R.; Bao, L.L.; Bian, J.; Hu, T.S.; Zheng, M.Z.; Yan, Y.J.; Chen, Z.L. Tetraphenylporphyrin derivatives possessing piperidine group as potential agents for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B* **2016**, *165*, 213–219. [CrossRef] [PubMed]
55. Roby, A.; Erdogan, S.; Torchilin, V.P. Enhanced in vivo antitumor efficacy of poorly soluble PDT agent, meso-tetraphenylporphine, in PEG-PE-based tumor-targeted immunomicelles. *Cancer Biol. Ther.* **2007**, *6*, 1136–1142. [CrossRef] [PubMed]
56. Wu, M.; Wu, L.; Li, J.; Zhang, D.; Lan, S.; Zhang, X.; Lin, X.; Liu, G.; Liu, X.; Liu, J. Self-Luminescing Theranostic Nanoreactors with Intraparticle Relayed Energy Transfer for Tumor Microenvironment Activated Imaging and Photodynamic Therapy. *Theranostics* **2019**, *9*, 20–33. [CrossRef] [PubMed]
57. Janku, F.; McConkey, D.J.; Hong, D.S.; Kurzrock, R. Autophagy as a target for anticancer therapy. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **2011**, *8*, 528–539. [CrossRef] [PubMed]
58. Xue, Q.; Wang, X.; Wang, P.; Zhang, K.; Liu, Q. Role of p38MAPK in apoptosis and autophagy responses to photodynamic therapy with Chlorin e6. *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* **2015**, *12*, 84–91. [CrossRef] [PubMed]
59. Xiong, L.; Liu, Z.; Ouyang, G.; Lin, L.; Huang, H.; Kang, H.; Chen, W.; Miao, X.; Wen, Y. Autophagy inhibition enhances photocytotoxicity of Photosan-II in human colorectal cancer cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 6419–6432. [CrossRef]
60. Wei, M.F.; Chen, M.W.; Chen, K.C.; Lou, P.J.; Lin, S.Y.F.; Hung, S.C.; Hsiao, M.; Yao, C.J.; Shieh, M.J. Autophagy promotes resistance to photodynamic therapy-induced apoptosis selectively in colorectal cancer stem-like cells. *Autophagy* **2014**, *10*, 1179–1192. [CrossRef]
61. Tu, P.; Huang, Q.; Ou, Y.; Du, X.; Li, K.; Tao, Y.; Yin, H. Aloe-emodin-mediated photodynamic therapy induces autophagy and apoptosis in human osteosarcoma cell line MG-63 through the ROS/JNK signaling pathway. *Oncol. Rep.* **2016**, *35*, 3209–3215. [CrossRef]
62. Zhu, J.; Tian, S.; Li, K.T.; Chen, Q.; Jiang, Y.; Lin, H.D.; Yu, L.H.; Bai, D.Q. Inhibition of breast cancer cell growth by methyl pyropheophenylchlorin photodynamic therapy is mediated though endoplasmic reticulum stress-induced autophagy in vitro and vivo. *Cancer Med.* **2018**, *7*, 1908–1920. [CrossRef]
63. Lepage, C.; Léger, D.Y.; Bertrand, J.; Martin, F.; Beneytout, J.L.; Liagre, B. Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells. *Cancer Lett.* **2011**, *301*, 193–202. [CrossRef]
64. Lu, J.; Liong, M.; Li, Z.; Zink, J.I.; Tamanoi, F. Biocompatibility, Biodistribution, and Drug-Delivery Efficiency of Mesoporous Silica Nanoparticles for Cancer Therapy in Animals. *Small* **2010**, *6*, 1794–1805. [CrossRef] [PubMed]
65. Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity. NIH Publication No. 01–4500. 2001. Available online: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/guidance0801/iv_guide.pdf (accessed on 3 April 2019).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

66. Li, J.; Hou, N.; Faried, A.; Tsutsumi, S.; Kuwano, H. Inhibition of autophagy augments 5-fluorouracil chemotherapy in human colon cancer in vitro and in vivo model. *Eur. J. Cancer.* **2010**, *46*, 1900–1909. [CrossRef] [PubMed]
67. Fidanzi-Dugas, C.; Liagre, B.; Chemin, G.; Perraud, A.; Carrion, C.; Couquet, C.Y.; Granet, R.; Sol, V.; Léger, D.Y. Analysis of the in vitro and in vivo effects of photodynamic therapy on prostate cancer by using new photosensitizers, protoporphyrin IX-polyamine derivatives. *Biochim. Biophys. Acta* **2017**, *1861*, 1676–1690. [CrossRef] [PubMed]

© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Carbohydrate Polymers 213 (2019) 168–175

Contents lists available at ScienceDirect

Carbohydrate Polymers

journal homepage: www.elsevier.com/locate/carbpol

Porphyrin-xylan-coated silica nanoparticles for anticancer photodynamic therapy

Soukaina Bouramtane[a], Ludovic Bretin[b], Aline Pinon[b], David Leger[b], Bertrand Liagre[b], Laurence Richard[c], Frédérique Brégier[a], Vincent Sol[a], Vincent Chaleix[a,*]

[a] Université de Limoges, Laboratoire PEIRENE, EA 7500, Faculté des Sciences et Techniques, 123 Avenue Albert Thomas, 87060 Limoges, France
[b] Université de Limoges, Laboratoire PEIRENE EA 7500, Faculté de Pharmacie, 2, rue du Docteur Marcland, 87025 Limoges, France
[c] Centre Hospitalier Universitaire de Limoges, Service d'Anatomie Pathologique – 2, avenue Martin Luther King, 87042 Limoges cedex, France

ARTICLE INFO

Keywords:
Xylan
Polysaccharides
Silica nanoparticles
Photodynamic therapy
Colorectal cancer

ABSTRACT

Porphyrins are widely used in anticancer photodynamic therapy (PDT). However, low physiological solubility and lack of selectivity towards cancer cells are the main limitations of their clinical use. Nanoparticles are being intensively explored as photosensitizer carriers for PDT to overcome these limitations. The aims of this work are to synthesize core-shell hybrid nanoparticles formed by a silica core and xylan carrying a 5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (TPPOH) shell, and evaluate their anticancer activity. To afford drug-controlled incorporation and enhance blood circulation, TPPOH was covalently linked to xylan. Different xylans with degrees of substitution in TPPOH ranging from 0.034 to 1.11, were obtained and characterized. Then, the xylan-TPPOH conjugate (PX) was used to coat the silica nanoparticles (PX SNPs). The obtained nano-objects were characterized and their therapeutic potential for photodynamic therapy evaluated against colorectal cancer cell lines. in vitro analysis showed that PX SNPs were 40-fold and 10-fold more effective against HCT116 cells and HT-29 cells respectively compared to free TPPOH.

1. Introduction

Being the second leading cause of death in the world, after cardiovascular pathologies, cancer is the most dreaded disease of our time (Nagai & Kim, 2017). It consists of the anarchic proliferation of abnormal cells which escape from normal control mechanisms. Several options are available for treating cancer; the most classic are surgery, chemotherapy and radiotherapy (Saini, Chouhan, Bagri, & Bajpai, 2012). These treatments are invasive and lack selectivity toward tumor cells. To better target cancer cells and minimize adverse effects, new or complementary treatments have emerged over the past few years.

Photodynamic therapy (PDT) is an alternative and non-invasive cancer treatment requiring the simultaneous presence of three elements: a photosensitive molecule, a light source and molecular oxygen (Kwiatkowski et al., 2018). PDT usually involves intravenous administration of a photosensitizer (PS) and subsequent specific-wavelength irradiation of the tumor tissue. When irradiated, the PS passes from the ground state to the excited singlet state. The excited photosensitizer is very unstable and loses its excess energy by, either non-radiative (heat emission) or radiative (fluorescence emission) pathways. Another process can occur, namely intersystem crossing, to form a more stable excited triplet state with parallel spins. In this case, return to the ground state, theoretically forbidden transition, is very slow. PS can be deactivated by phosphorescence or by reacting with its environment according to two types of mechanisms. The Type I mechanism involves electron transfer from photosensitizer to biological substrates to form radicals and radical ions which, after interaction with oxygen, provide reactive oxygen species (ROS) such as the superoxide radical anion ($O_2^{\cdot -}$). A Type II photochemical process consists of a triplet-triplet energy transfer from PS to molecular oxygen in its ground state (triplet state). This energy transfer leads to the formation of singlet oxygen $^1O_2$ and thus regenerates the ground-state photosensitizer. All these species are highly reactive and are very powerful oxidants that can damage cancer cells and lead to their death (Bonnett, 1995; Henderson & Dougherty, 1992). Tetrapyrrole compounds such as porphyrins, chlorins, and bacteriochlorins are the most utilized photosensitizers in PDT (Abrahamse & Hamblin, 2016; Sternberg, Dolphin, & Brückner, 1998). However, these hydrophobic molecules are sparingly soluble in biological fluids and they suffer from poor selectivity towards tumor cells which restricts their use in clinical protocols.

Several approaches have been developed to improve PS bioavailability and efficacy in PDT. One of the most promising is the attachment

* Corresponding author.
E-mail address: vincent.chaleix@unilim.fr (V. Chaleix).

https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.070
Received 4 December 2018; Received in revised form 14 February 2019; Accepted 19 February 2019
Available online 20 February 2019
0144-8617/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

of PS to nanoparticles (NPs) (Kydd et al., 2017) which not only enhances the solubility of hydrophobic photosensitizers but also promotes their deposition inside tumors, due to so-called passive targeting. Indeed, leaky vasculature and the resulting aberrant architecture of solid tumors leads to preferential nanoparticle accumulation in tumors which remain there because of poor lymphatic drainage. This phenomenon, known as Enhanced Permeability and Retention (EPR) effect, was first described by Matsumura and Maeda (Maeda & Matsumura, 1989; Maeda, 2001; Matsumura & Maeda, 1986).

Various NPs have been used as delivery systems for water-insoluble drugs (Debele, Peng, & Tsai, 2015), and especially silica nanoparticles (SNPs), which have been recognized as promising vectors for PDT applications (Bharathiraja et al., 2017; Brezániová et al., 2018; Roy et al., 2003; Yan & Kopelman, 2003; Yan et al., 2017). In the last two decades, SNPs have gained an ever-increasing interest for medical applications because of a large number of qualities, including biocompatibility, stability, high specific surface area, ease of synthesis with controllable size, shape and surface charge, along with their ease of functionalization with a number of varied materials (Tamba et al., 2015).

A major obstacle to controlled drug delivery is the mononuclear phagocytic system (MPS) which is responsible for the premature removal of drug carriers from the body through opsonization (Frank & Fries, 1991; Gref et al., 1994). One solution proposed to slow opsonization and increase nanoparticle half-lives in the bloodstream by coating them with hydrophilic groups via adsorption or covalent grafting (Lemarchand, Gref, & Couvreur, 2004). These groups generally consist of long chain polymers such as polyethylene glycol (PEG) (Mozar & Chowdhury, 2018; Peracchia et al., 1999), or polysaccharides such as chitosan (Zhu et al., 2009) and dextran (Coombes et al., 1997; Mbakidi et al., 2013). These polymers create a hydrophilic protective layer around the nanoparticles which prevents the binding of opsonins via steric repulsion forces, thereby delaying opsonization and phagocytosis (Owens & Peppas, 2005).

Xylan is a natural, biodegradable, and non-toxic biomaterial. It is the main hemicellulose component of secondary cell walls constituting approximately 20–30% of the biomass of dicotyl plants (hardwoods and herbaceous plants). In hardwood, 4-*O*-methylglucuronoxylan (MGX) is the most abundant hemicellulose. Its structure consists of a β(1-4)-D-xylopyranosyl backbone with 4-*O*-methyl-D-glucuronic acid (MeGlcA) side chains attached at the 2 position of the xylose units (Ebringerová, Hromádková, & Heinz, 2005). The degree of substitution in MeGlcA depends on the forest species and varies between 3.7 and 12 xylose units for one 4-*O*-methylglucuronic acid unit in hardwoods. Xylan obtained from corn cobs has been reported to exhibit antioxidant, anticoagulant, antimicrobial and antiproliferative properties. Corn cob xylan has been shown to exert an antiproliferative effect against HeLa cell lines in a dose-dependent manner (Melo-Silveira et al., 2012). In another study, chestnut tree MGX was found to inhibit proliferation of A431 human squamous carcinoma cells, as well as migration and invasion by inhibiting the expression of metalloproteinases MMP2 and MMP9, which are involved in the degradation of the cell basement membrane and subsequent migration through extracellular matrices (Moine et al., 2007). In drug delivery, esterification of beech wood xylan via activation of the carboxylic acid with *N*, *N*-carbonyldiimidazole has been performed to produce prodrugs for the controlled release of ibuprofen (Daus & Heinze, 2010). The surface modification of magnetic nanoparticles (MNPs) with xylan has also been reported to stabilize MNPs in biological media and been shown to improve their biocompatibility and biodistribution (Ma et al., 2018).

The functionalization of xylan by porphyrins has never been reported in the literature. We hypothesize that it should be possible to condense porphyrins on xylan by esterification and to control the degree of substitution through the implementation of a well-chosen experimental design. We assume that it must be possible to obtain nanoobjects with high porphyrin content through surface coating of SNPs with PX conjugate. We also assume that the anticancer activity of these nanoparticles will be higher than that of free TPPOH.

In adequation with our research program on polysaccharide modifications with photosensitizers for PDT applications (Drogat et al., 2012; Ringot et al., 2018), and in order to develop new photosensitizer carriers for PDT applications, we prepared and characterized core-shell hybrid nanoparticles based on xylan for the targeted delivery of 5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin, a second-generation photosensitizer that is relatively easy to synthesize and exhibits a singlet oxygen quantum yield of $\Phi\Delta = 0.57$ (Managa et al., 2016). TPPOH was covalently linked to xylan via an esterification reaction and then this conjugate was attached to SNPs through ionic bonds. The in vitro cytotoxicity and photodynamic efficiency of these nanomaterials were determined against HCT116 and HT-29 colorectal cancer cell lines.

2. Materials and methods

2.1. Materials

For a list of materials, see Supplementary information (SI).

2.2. Analytical methods

FTIR analyses were performed on a Perkin Elmer FT-IR Spectrum 1000 spectrometer using KBr pellets (1–2 wt%). NMR analyses were carried out on a Bruker DPX 500 NMR spectrometer, operating at 500 MHz. UV–vis spectra were recorded on a double beam spectrophotometer AnalytikaJena SPECORD 210, using 10 mm quartz cells. High resolution electrospray ionization mass spectrometry (HR ESI-MS) was performed at the ICOA/CBM platform (Orléans University) on a Bruker Q-TOF maXis mass spectrometer, coupled to an Ultimate 3000 RSLC chain (Dionex). Purifications were performed with Combiflash Rf 100® from Teledyne Isco. The stationary phase consisted of an 80 g silica column. The products to be purified were solubilized in a minimum amount of solvent and fixed on Florisil (60–100 mesh, VWR). For Transmission Electron Microscopy (TEM) studies, one droplet of nanoparticle suspension was lyophilized on a copper grid. Images were taken with a JEOL 2010 UHR instrument. Particle size distribution and zeta potential were analyzed through dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern, UK). SNPs suspension was diluted in absolute ethanol and analyzed at 20 °C at a scattering angle of 173°. The mean diameter of SNPs was expressed as the average value of two measurements, each one comprising 15 runs. Zeta potential data was collected through electrophoretic light scattering at 20 °C, 150 V using this same instrument. Each zeta potential value is the average of two measurements, each one comprised of 100 single runs. Red light (630–660 nm, 75 J/cm2) was delivered from the light source PhotoCureTM Lamp CURElight (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). Cell morphology was analyzed by an electron microscope JEOL JEM-1011 operated at 80 KeV (JEOL, Croissy-sur-Seine, France).

2.3. Porphyrin synthesis

2.3.1. [3-ethoxycarbonylpropyloxy] phenyl) -10,15,20-triphenylporphyrin (2)

5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (**1**) was synthesized according to the Little method (Boscencu, Licsandru, Socoteanu, Oliveira, & Ferreira, 2007; Little, Anton, Loach, & Ibers, 1975). Compound **1** (0.2 g, 1 equiv, 0.32 mmol) was dissolved in 15 mL of DMF with excess K_2CO_3 (25 equiv, 1.09 g, 7.92 mmol) and stirred for 5 min at room temperature. Then 0.43 g of ethyl 4-bromobutyrate (7 equiv, 2.22 mmol) were added. The reaction was carried out using microwave irradiation at 120 °C and 300 W for 7 min and monitored by thin-layer chromatography (TLC). After evaporation of DMF under vacuum, the crude product was dissolved in chloroform (15 mL). The organic layer was washed with water (3 × 30 mL), dried ($MgSO_4$) and then

Ludovic BRETIN | Thèse de doctorat | Université de Limoges | 2019
Licence CC BY-NC-ND 3.0

evaporated to give, after purification by flash chromatography on a silica column, (eluent: petroleum ether/$CHCl_3$ from 80 to 100%) a pure porphyrin **2** with 91% yield. Rf = 0.44 ($CHCl_3$), ^{1}H NMR ($CDCl_3$, 500.15 MHz) δH, ppm : −2.74 (s, 2H, NH pyrrole), 1.32 (t, 3H, J = 7.5 Hz, CH_3 ethyl), 2.27 (q, 2H, J = 6.5 Hz, Hβ $-CH_2-$), 2.66 (t, 2H, J = 7.5 Hz, $-CH_2$-C=O), 4.22 (q, 2H, J = 7 Hz, CH_2 ethyl), 4.25 (t, 2H, J = 6 Hz, $-O-CH_2-$), 7.22 (d, 2H, J = 8.5 Hz, H3,5 aryl), 7.72 (m, 9H, H3,4,5 phenyl), 8.10 (d, 2H, J = 8.5 Hz, H2,6 aryl), 8.20 (d, 6H, J = 7.5 Hz, H2,6 phenyl), 8.83 (s, 8H, Hβ pyrrole). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 500.15 MHz) δc, ppm : 14.31 (CH_3 ethyl) ; 24.87 ($-CH_2-$) ; 30.99 ($CH_2-C=O$) ; 60.52 (CH_2 ethyl); 67.03 ($O-CH_2$); 112.72 (C-3,5 aryl); 119.96–120.07 (C meso); 126.68–127.67 (C phenyl); 130.88–131.13 (Cβ pyrrole); 134.54–134.59 (C-2,6 aryl); 135.59 (C-1 aryl) ; 142.19–142.22 (Cα pyrrole); 158.70 (C-4 aryl); 173.30 (C=O). UV–vis: UV–vis ($CHCl_3$) λ max nm (ε, 10^3 L mol^{-1} cm^{-1}) : 420 (609), 519 (21), 553 (10), 591 (6), 649 (5). MS (ESI): m/z = 745.3173 $[M+H]^+$.

2.3.2. 5-(2-[3-carboxypropyloxy] phenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin (3)

Compound **2** (0.3 g, 1 equiv, 0.4 mmol) was dissolved in 15 mL DMF and then 0.16 g (10 equiv, 4 mmol) NaOH previously dissolved in 2 mL of distilled water, was added. The reaction was allowed to proceed under stirring for 2 h at 100 °C. After solvent evaporation, the crude product was dissolved in chloroform (15 mL) and neutralized with 287.5 µL hydrochloric acid (HCl) (37%, 12 M), washed with distilled water (3 × 30 mL), dried over $MgSO_4$, and evaporated. Then, the crude product was purified by flash chromatography to give TPPOH (compound **3)** as a purple solid (yield 96%) (eluent: $CHCl_3$/Ethanol from 100 to 90%). Rf = 0.6 (EtOH/$CHCl_3$ 1/9), ^{1}H NMR ($CDCl_3$ + 10% TFA, 500.15 MHz) δH, ppm: 2.39 (q, 2H, $-CH_2-$, J = 8 Hz), 2.86 (t, 2H, CH_2-C=O, J = 6.5 Hz), 2.48 (t, 2H, CH_2-O, J = 6 Hz), 7.56 (d, 2H, H3,5 aryl, J = 7.7 Hz), 8.02 (m, 9H, H3,4,5 phenyl), 8.53 (m, 8H, H2,6 phenyl, H2,6 aryl), 8.7 (s, 8H, Hβ pyrrole). ^{13}C NMR ($CDCl_3$, 500.15 MHz) δc, ppm : 24.6 ($-CH_2$-) ; 30.9 ($CH_2-C=O$) ; 67.1 ($O-CH_2$); 115.09 (C-3,5 aryl); 122.44–123.98 (C meso) ; 128.79–129.55 (C phenyl) ; 130.79–133.02 (C βpyrrole) ; 139.2-138.3 (C-2,6 aryl); 140.3 (C1 aryl) ; 146.46-145.17(C αpyrrole) ; 161.1 (C-4 aryl) ; 181 (C=O). UV–vis ($CHCl_3$) λ max nm (ε, 10^3 L. mol^{-1}. cm^{-1}): 420 (451), 516 (21), 553 (10), 591 (6), 647 (5). MS (ESI): m/z = 717.286 $[M+H]^+$.

2.4. Synthesis of PX

2.4.1. Solubilization of xylan

Xylan (1 g) was dissolved in 20 mL DMSO (60 °C) and filtered to remove the insoluble fraction. To determine the concentration of this solution, 1 mL was precipitated with 3 mL absolute ethanol, filtered and dried under vacuum. The mass of precipitated xylan was 44.5 mg, therefore the xylan solution in DMSO had a concentration of 44.5 mg/mL (absence of polysaccharide in the filtrate was verified by TLC.

2.4.2. TPPOH grafting to xylan

All syntheses were carried out following the same protocol. TPPOH was added to 1 equivalent of *N*, *N*-carbonyldiimidazole (CDI) and stirred in DMSO at room temperature for 24 h. This solution was then added to a solution of 100 mg (0.76 mmol anhydroxylose unit) xylan in DMSO and allowed to react under stirring. Reaction parameters are summarized in Table S1 (SI). The product was precipitated out in absolute ethanol and was washed three times with ethanol and three times with chloroform to remove unreacted starting material and then dried under vacuum.

2.5. Synthesis and surface modification of SNPs

3 mL aqueous ammonia (28%) and 1.5 mL tetraethoxysilane (TEOS) were successively added dropwise to 45 mL absolute ethanol. This solution was stirred for 4 h at 48 °C. Resulting SNPs were collected by centrifugation (8000 rpm, 30 min), washed three times with ethanol and then dispersed in 25 mL 96% ethanol. Then, 4 mL (3-aminopropyl) triethoxysilane (APTES) was added and stirred overnight. After three cycles of centrifugation/redispersion in ethanol, SNPs were obtained as a white solid and were stored in 25 mL of absolute ethanol.

2.6. Grafting of PX onto surface-modified SNPs

PX (10 mg) was dissolved in 20 mL distilled water. Then 100 mg SNPs in ethanol were added dropwise and ultrasonicated during the addition. This mixture was then stirred for 20 min. The resulting PX SNPs were centrifuged and washed three times with water and absolute ethanol.

2.7. Determination of TPPOH concentration in SNPs

The amount of TPPOH attached to the SNPs was determined by UV–vis assay. PX SNPs were dispersed in absolute ethanol at a concentration of 10 mg/mL and diluted to 0.5 mg/mL. Absorbance of this sample was measured at 418 nm, and absorbance of SNPs was subtracted. The PX content of SNPs was calculated from a calibration curve constructed with different concentrations of free PX in distilled water. The concentration of TPPOH in mol/L was calculated according to Eq. (1):

$$C = \frac{DSxM(PX)}{M(repeat\quad unit\quad of\quad xylan) + DSx(M(TPPOH) - 18)} \tag{1}$$

M(PX) = concentration of PX in g/L attached to SNPs, calculated from the standard calibration curve

M (repeat unit of xylan: xyl/MeGlcA 10 :1) = 1511 g/mol.

M (TPPOH) = 717.286 g/mol.

2.8. In vitro experiments

2.8.1. Cell lines, cell culture, and PX SNPs

For all experiments, cells were seeded at 1.2 × 10^4 cells/cm^2 and 2.08 × 10^4 cells/cm^2 for HCT116 and HT-29 cells, respectively and were grown for 24 h in culture medium prior to exposure, or lack of, to TPPOH or PX SNPs at indicated concentrations. Stock solutions of TPPOH (5 mg/mL) and PX SNPs 80 nm (20 mg/mL) were prepared in ethanol.

2.8.2. PX SNPs toxicity tests

PX-SNPs cytotoxicity was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays. Human colorectal cancer cells were seeded at 4 × 10^3 cells/well and 7 × 10^3 cells/well for HCT116 and HT-29 cells, respectively, in 96-well culture plates and grown for 24 h in culture medium prior to exposure, or lack of, to TPPOH or PX SNPs. Stock solutions of TPPOH and PX SNPs were diluted in culture medium to obtain the appropriate final concentrations. The same amount of vehicle (percentage of ethanol did not exceed 0.6%) was added to control cells. After 24 h, culture medium was replaced by phenol red-free culture medium and cells were irradiated, or not, by red light (630–660 nm, 75 J/cm^2). MTT assays were done 48 h after irradiation and experiments were performed in triplicate.

2.8.3. Transmission electron microscopy (TEM)

HCT116 cells (3 × 10^5) were seeded in 25 cm^2 tissue culture flasks and grown for 24 h in culture medium prior to exposure or not to PX SNPs. After 24 h, culture medium was replaced by phenol red-free culture medium and cells were irradiated, or not, by red light (75 J/cm^2). Then, cells were fixed in 2.5% glutaraldehyde for 30 min at room temperature and washed in phosphate buffer for 15 min. They were then incubated in 1% osmium tetroxide solution for 30 min at room

Licence CC BY-NC-ND 3.0

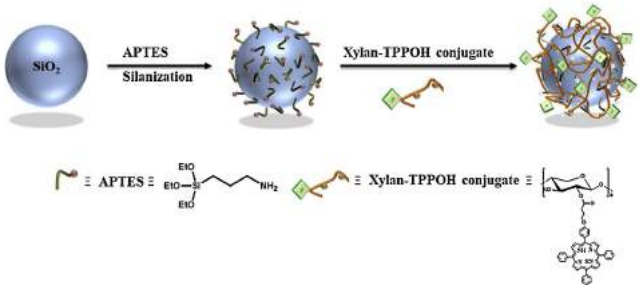


Fig. 1. General procedure for the synthesis of PX SNPs.

temperature, dehydrated with increasing ethanol concentrations, and embedded in epon. They were polymerized over 48 h at 60 °C and ultrathin sections (80–100 nm) were prepared. Grids were stained with uranyl acetate and lead citrate and examined with TEM operated at 80 KeV.

2.8.4. Statistical analysis

Data are expressed as the arithmetic means ± standard error of the mean (SEM) of separate experiments. The statistical significance of results obtained from in vitro studies was evaluated by the two tailed unpaired Student's t-test, with $p < 0.05$ being considered as significant.

3. Results and discussion

Preparation of PX SNPs is summarized in Fig. 1. TPPOH was conjugated with xylan via an esterification reaction forming PX which was used in the surface modification of SNPs. The presence of glucuronic acid groups on xylan allows the formation of ionic bonds on the surface of SNPs which is made cationic by APTES.

3.1. Characterization of xylan

The xylan used in this study was characterized by the classical methods already described in the literature (Kerrouche et al., 2018). It had an average polymerization degree of 208 calculated as the ratio of amount of total sugars to the quantity of reducing sugars. The composition was characterized by colorimetric assay and contained 92.5% xylose and 7.5% glucuronic acids. ^{1}H NMR spectrum of this xylan (Fig. S1, SI) showed the signal corresponding to anomeric protons of substituted xylose units at 4.5 ppm, non-substituted xylose units at 4.6 ppm and anomeric protons of uronic acid at 5.3 ppm. The degree of substitution of xylan by 4-*O*-methylglucuronic acid, which was about 1/10, was calculated according to Eq. (A.1, SI).

3.2. PX synthesis

The synthesis route of PX is summarized in Fig. 2. First, 5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin **(1)** was synthesized according to the Little method and obtained with a 3.7% yield in agreement with the literature. It was then functionalized with ethyl 4-bromobutyrate through nucleophilic substitution, activated by microwave irradiation according to Chaleix et al. (2009). Product **2** was obtained with 91% yield. After saponification with sodium hydroxide, porphyrin derivative **3** was obtained with 96% yield. The structures of all compounds were confirmed by ^{1}H, ^{13}C NMR and mass spectrometry. Compound **3** was then covalently attached to xylan by esterification using CDI as the coupling reagent.

The covalent binding between xylan and TPPOH was confirmed by FTIR. The corresponding FTIR spectrum of PX is displayed in Fig. 3(c). This compound and native xylan (Fig. 3b), shared a characteristic absorption band around 3400 cm^{-1}, which has been assigned to the stretching vibrations of hydroxyl groups of xylan. There were two other bands at 2920 cm^{-1} and 1441 cm^{-1} that represent the stretching and deformation vibrations of C—H bond. PX also displayed new signals that correspond to the TPPOH moiety (1245, 1178, 796, 730 cm^{-1}) and a peak at 1739 cm^{-1} that corresponds to the carbonyl functionality of TPPOH. The ^{1}H NMR spectrum of modified xylan (Fig. 4) identified protons of the xylose units between 3 and 5.5 ppm, and the peripheral protons of TPPOH between 7 and 9 ppm. The broad singlet at −2.9 ppm was assigned to the NH internal protons of the porphyrin pyrrole units, which is in agreement with classical ^{1}H NMR spectra of porphyrins.

3.3. Experimental design

Esterification reactions are mainly influenced by reaction time, temperature and molar ratio of reagents. The efficiency of this esterification reaction was expressed by the degree of substitution and weight yield. In order to determine optimal conditions and study the variations of the degree of substitution (DS) and weight yield as a function of temperature, reaction time and TPPOH equivalents, an experimental design was built. The choice of factors and their modes are listed in Table S2 (SI). For 3 factors, 27 experiments needed to be performed to explore the entire experimental field. In order to reduce the number of tests and still keep the possibility of studying all factors,

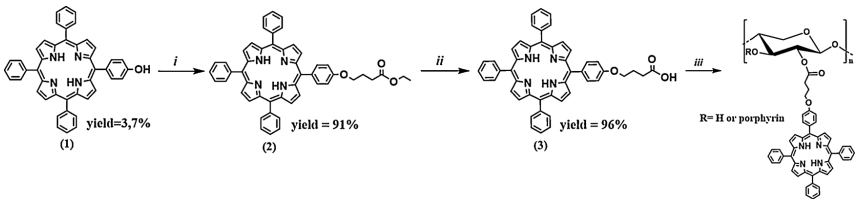


Fig. 2. Synthesis of PX. *i*: ethyl 4-bromobutyrate, K_2CO_3, DMF, MW; *ii*: NaOH, DMF/Water, HCl (0.1 M); *iii*: Xylan, DMSO, CDI, t(h), T(°C).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

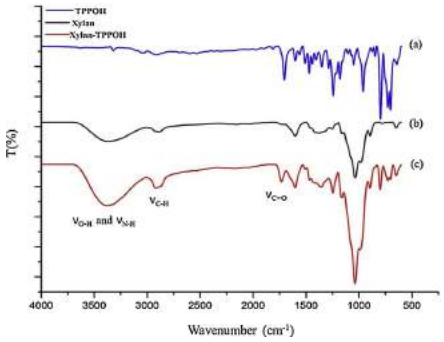


Fig. 3. FTIR Spectra of TPPOH (a), native xylan (b), and PX (c).

a latin square design of experiments was constructed. In this way only nine experiments were performed, applying the experimental conditions summarized in Table S1 (SI). For the nine samples, DS and weight yield were measured and the obtained values listed in Table S3 (SI).

DS was expressed as the number of TPPOH molecules per xylan repeat unit. The DS value was calculated from ^{1}H NMR data according to Eq. (2):

$$DS = \frac{H(TPPOH)/27}{H1(xylan)/10} \quad (2)$$

Where H(TPPOH) is the integral area of TPPOH protons at δ 7.26–9.12 ppm, and H1(xylan) is the integral area of anomeric protons of substituted and non-substituted xylose units at δ 4.12–4.7 ppm. To determine the effect of each factor on the degree of substitution in TPPOH, independently from the other factors, an average DS for each modality was calculated. Then, variation of the mean DS according to the modalities of the three factors was examined. As shown in Fig. 5, at all temperature and reaction times, an increase in TPPOH equivalents led to an increase in DS. Reaction time had no significant effect on DS beyond 24 h. Furthermore, temperature increases over 50 °C resulted in a drop in DS.

The influence of these factors on weight gain was also studied. The variation of the average weight yield according to each factor is illustrated in Fig. 6.

Increases in the amount of TPPOH led to increased weight yields, and a slight increase in weight was observed as a function of reaction time beyond 24 h. Temperatures above 50 °C induced a slight decrease in DS.

Different degrees of substitution ranging from 0.034 to 1.11 were obtained. Among the nine samples we chose S9 sample showed the highest DS in TPPOH (DS = 0.2) while remaining water soluble.

3.4. Synthesis of core-shell hybrid nanoparticles

3.4.1. Synthesis of SNPs

To prepare core-shell hybrid nanoparticles, SNPs were first synthesized by the sol-gel process based on the modified Stöber method (Stöber, Fink, & Bohn, 1968), using TEOS as starting material. Monodispersed colloidal silica particles were produced by hydrolysis and polycondensation of TEOS, in the presence of ammonia as a catalyst in alcoholic media.

TEM images showed spherical shape nanoparticles with an average diameter of 80 nm (Fig. 7A). Dynamic light scattering (DLS) confirmed TEM results and the hydrodynamic diameter was measured as 78.43 ± 19.92 nm with a 0.062 polydispersity index (PDI). Zeta potential measurements showed the presence of negative charges on the

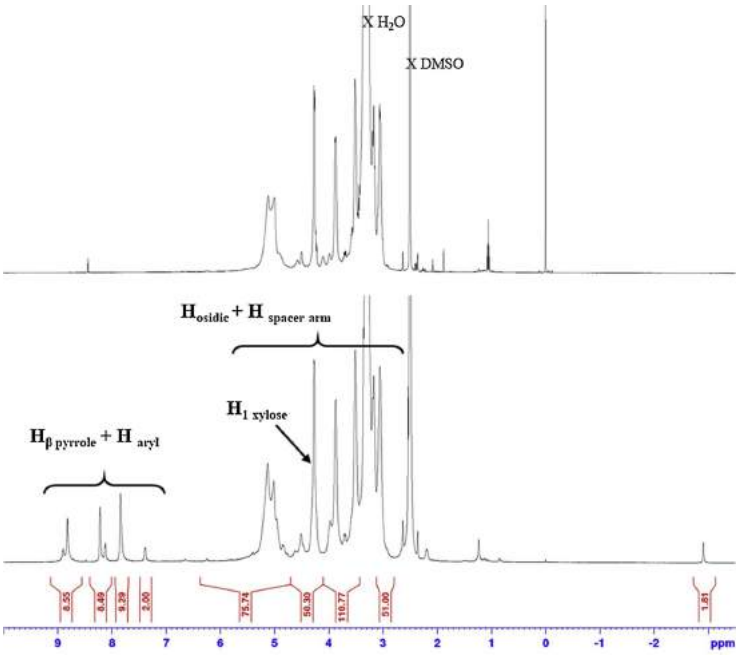


Fig. 4. ^{1}H NMR spectra of native xylan (a), and PX (b) in DMSO (DS = 0.2).

Licence CC BY-NC-ND 3.0

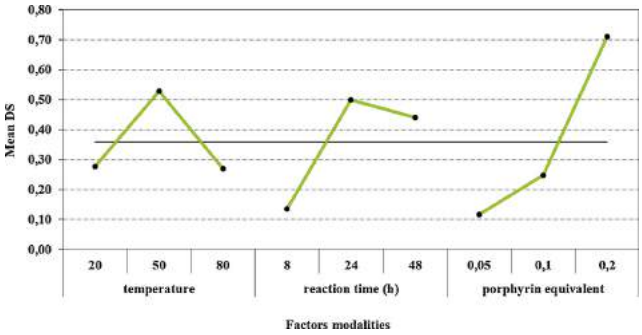


Fig. 5. Average effect of temperature, reaction time and TPPOH equivalent on DS.

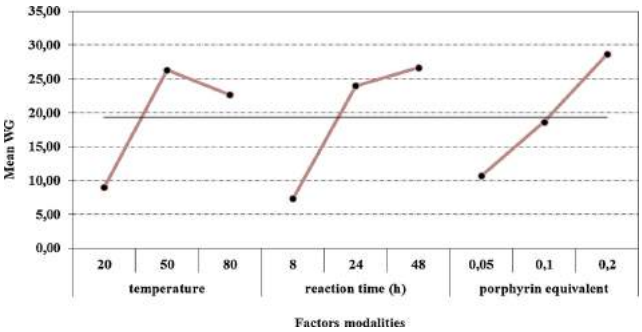


Fig. 6. Effects of temperature, reaction time and TPPOH equivalent on weight yield.

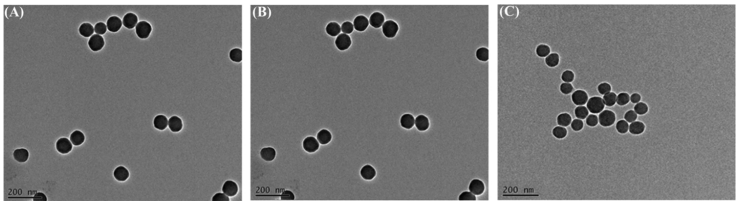


Fig. 7. TEM images of (A) SNPs, (B) SNPs-APTES, and (C) PX SNPs.

Table 1
In vitro phototoxicity of PX SNPs in human colorectal cancer cells.

	IC_{50} (nM)	
	HCT116	HT-29
TPPOH free	2943 ± 102	5959 ± 430
PX SNPs[a]	72.6 ± 2.8	550.2 ± 7.5

[a] IC50 nM concentrations are directly corresponding to the amount of TPPOH on the SNPs.

surface of nanoparticles due to hydroxyl groups, as reported in Table S4 (SI).

These nanoparticles were then functionalized by APTES according to the same sol-gel mechanism. The surface modification of SNPs was confirmed by zeta potential measurements. Results showed the presence of positive charges on the surface of nanoparticles due to the ammonium groups supplied by APTES. TEM measurements (Fig. 7B) showed no significant changes in size compared to starting nanoparticles. DLS size distribution and zeta potential curves are reported in Fig. S2 (SI).

3.4.2. Functionalization of SNPs with PX

Beech xylan exhibits a specific xylose to methyl-glucuronic acid ratio estimated to be 10:1. Furthermore, it has been reported that the pKa value for the most common types of uronic acids found in xylan is 3.2–3.7 (Österberg, Laine, Stenius, Kumpulainen, & Claesson, 2001). Therefore, in ultra-pure water (pH ~ 6.5) glucuronic acid groups will allow the attachment of xylan to the SNPs through ionic bonds with the previously introduced ammonium groups. In practice, a suspension of SNPs in ethanol was added dropwise to a solution of PX in water. The resulted PX SNPs were collected by centrifugation and the unattached polymer was removed by washing several times with water. Color change of SNPs after coating with PX can be seen in Fig. S3 (SI). TEM measurements (Fig. 7C) showed no significant changes in size and shape of SNPs.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

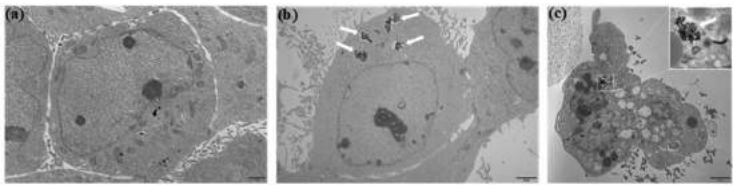


Fig. 8. TEM analysis of HCT116 cells (a) control cell (irradiated) (b) PX SNPs (dark), (c) PX SNPs (irradiated); White arrows indicate SNPs inside cytoplasm.

The functionalization of SNPs with PX was confirmed by UV–vis analysis (Fig. S4, SI). The amount of PX bound to the nanoparticles was evaluated using a standard calibration curve obtained from different concentrations of free PX diluted in water. We used a PX characterized by a 0.2° of substitution which associated 9.77×10^{-6} mol TPPOH per gram of silica (Table S5, SI).

3.5. In vitro cytotoxicity of PX SNPs

Phototoxicity of TPPOH and PX SNPs was studied in two human colorectal cancer cell lines with different grade: HCT116 (grade I) and HT-29 (grade II). Toxicity was determined 48 h post-irradiation by MTT assay. Both compounds proved to be non toxic against cells kept in the dark (data not shown). When the PS was irradiated by 630–660 nm red light, strong toxicity was exerted on the cell lines. IC_{50} values were determined (Table 1) in order to compare PS effects. We observed that TPPOH was less effective against the two human colorectal cancer cell lines. In fact, compared to TPPOH, PX SNPs were 40-fold and 10-fold more effective against HCT116 cells against HT-29 cells respectively, the former being significantly less resistant than the latter. These compounds were used at their respective IC_{50} values in the next experiments.

The morphology of HCT116 cells was characterized by TEM analysis (Fig. 8). After 630–660 nm irradiation, untreated cells exhibited abundant microvilli, the sign of normal morphology. Cells treated with PX SNPs kept in the dark showed NPs uptake without morphological changes. However, cells treated with PX SNPs and then irradiated showed complete breakdown of intracellular structures. These cells exhibited morphological features such as cell membrane shrinkage, nuclear condensation and formation of phagocytic vesicles or apoptotic bodies, hallmark events of apoptotsis (Elmore, 2007).

4. Conclusion

Xylan was successfully modified with TPPOH and nine samples were obtained with DS ranging from 0.034 to 1.11. The sample showing the highest DS in TPPOH while remaining soluble in water was used to coat SNPs through ionic bonds. The color change of SNPs even after several washes with distilled water indicated efficient coating of SNPs with PX. Thus, xylan proved effective for the surface incorporation of active molecules in controlled quantities. At the cellular level, the conjugation of TPPOH to SNPs significantly enhanced its solubility and consequently its uptake by cancer cells. Therefore, the cell-killing efficiency was higher with PX SNPs compared to free TPPOH. Furthermore, cell death occurred by apoptosis as confirmed by TEM morphological characterization.

Acknowledgments

The authors are indebted to Dr. Michel Guilloton, Dáire Gibbons, and Jeanne Moreau for help in manuscript editing, and they gratefully acknowledge Pierre Carles (Carmalim Plateform- IRCER–University of Limoges) for TEM images and Dr. Yves Champavier for NMR analysis.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.070.

References

Abrahamse, H., & Hamblin, M. R. (2016). New photosensitizers for photodynamic therapy. *Biochemical Journal, 473*, 347–364.
Bharathiraja, S., Moorthy, M. S., Manivasagan, P., Seo, H., Lee, K. D., & Oh, J. (2017). Chlorin e6 conjugated silica nanoparticles for targeted and effective photodynamic therapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 19*, 212–220.
Bonnett, R. (1995). Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. *Chemical Society Reviews, 24*, 19–33.
Boscencu, R., Licsandru, D., Socoteanu, R., Oliveira, A. S., & Ferreira, L. F. V. (2007). Synthesis and spectral characterization of some unsymmetrically-substituted meso-porphyrinic compounds. *Revista de Chimie, 58*, 498–501.
Brezániová, I., Záruba, K., Králová, J., Sinica, A., Adámková, H., Ulbrich, P., et al. (2018). Silica-based nanoparticles are efficient delivery systems for temoporfin. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 21*, 275–284.
Chaleix, V., Couleaud, P., Sol, V., Zerrouki, R., Alves, S., & Krausz, P. (2009). Microwave-assisted expeditious O-alkylation of *meso*-hydroxyphenylporphyrins. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines, 13*, 888–892.
Coombes, A. G. A., Tasker, S., Lindblad, M., Holmgren, J., Hoste, K., Toncheva, V., et al. (1997). Biodegradable polymeric microparticles for drug delivery and vaccine formulation: The surface attachment of hydrophilic species using the concept of poly (ethylene glycol) anchoring segments. *Biomaterials, 18*, 1153–1161.
Daus, S., & Heinze, T. (2010). Xylan-based nanoparticles: Prodrugs for ibuprofen release. *Macromolecular Bioscience, 10*, 211–220.
Debele, T. A., Peng, S., & Tsai, H. C. (2015). Drug carrier for photodynamic cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences, 16*, 22094–22136.
Drogat, N., Granet, R., Le Morvan, C., Bégaud-Grimaud, G., Krausz, P., & Sol, V. (2012). Chlorin-PEI-labeled cellulose nanocrystals: Synthesis, characterization and potential application in PDT. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 22*, 3648–3652.
Ebringerová, A., Hromádková, Z., & Heinz, T. (2005). Hemicellulose. *Advances in Polymer Science, 186*, 1–67.
Elmore, S. (2007). Apoptosis: A review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology, 35*, 495–516.
Frank, M. M., & Fries, L. F. (1991). The role of complement in inflammation and phagocytosis. *Immunology Today, 12*, 322–326.
Gref, R., Minamitake, Y., Peracchia, M. T., Trubetskoy, V., Torchilin, V., & Langer, R. (1994). Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science, 263*, 1600–1603.
Henderson, B. W., & Dougherty, T. J. (1992). How does photodynamic therapy work? *Photochemistry and Photobiology, 55*, 145–157.
Kerrouche, D. J., Sadoun, T., Stoclet, G., Sol, V., Gloaguen, V., & Chaleix, V. (2018). Synthesis and characterization of xylan-graft-poly(L-lactide). *International Journal of Polymer Analysis and Characterization, 23*, 193–206.
Kwiatkowski, S., Knap, B., Przystupski, D., Saczko, J., Kędzierska, E., Knap-Czop, K., et al. (2018). Photodynamic therapy–Mechanisms, photosensitizers and combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy, 106*, 1098–1107.
Kydd, J., Jadia, R., Velpurisiva, P., Gad, A., Paliwal, S., & Rai, P. (2017). Targeting strategies for the combination treatment of cancer using drug delivery systems. *Pharmaceutics, 9*, 46.
Lemarchand, C., Gref, R., & Couvreur, P. (2004). Polysaccharide-decorated nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 58*, 327–341.
Little, R. G., Anton, J. A., Loach, P. A., & Ibers, J. A. (1975). The synthesis of some substituted tetraarylporphyrins. *Journal of Heterocyclic Chemistry, 12*, 343–349.
Ma, J., Li, D., Zhong, L., Du, F., Tan, J., Yang, J., et al. (2018). Synthesis and characterization of biofunctional quaternized xylan-Fe2O3 core/shell nanocomposites and modification with polylysine and folic acid. *Carbohydrate Polymers, 199*, 382–389.
Maeda, H. (2001). The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. *Advances in Enzyme Regulation, 41*, 189–207.
Maeda, H., & Matsumura, Y. (1989). Tumoritropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems, 6*, 193–210.
Managa, M., Mack, J., Gonzalez-Lucasb, D., Remiro-Buenamañana, S., Tshangana, C., Cammidge, A. N., et al. (2016). Photophysical properties of

Licence CC BY-NC-ND 3.0

tetraphenylporphyrinsubphthalocyanine conjugates. *Journal of Porphyrins and Phtalocyanines, 20*, 1–20.
Matsumura, Y., & Maeda, H. (1986). A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: Mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Research, 46*, 6387–6392.
Mbakidi, J.-P., Herke, K., Alvès, S., Chaleix, V., Granet, R., Krausz, P., et al. (2013). Synthesis and photobiocidal properties of cationic porphyrin-grafted paper. *Carbohydrate Polymers, 99*, 333–338.
Melo-Silveira, R. F., Fidelis, G. P., Pereira Costa, M. S. S., Silva Telles, C. B., Dantas-Santos, N., de Oliveira Elias, S., et al. (2012). *In vitro* antioxidant, anticoagulant and antimicrobial activity and in inhibition of cancer cell proliferation by xylan extracted from corn cobs. *International Journal of Molecular Sciences, 13*, 409–426.
Moine, C., Krausz, P., Chaleix, V., Sainte-Catherine, O., Kraemer, M., & Gloaguen, V. (2007). Structural characterization and cytotoxic properties of a 4-O-methylglucuronoxylan from castanea sativa. *Journal of Natural Products, 70*, 60–66.
Mozar, F. S., & Chowdhury, E. H. (2018). PEGylation of carbonate apatite nanoparticles prevents opsonin binding and enhances tumor accumulation of gemcitabine. *Journal of Pharmaceutical Sciences, 107*, 2497–2508.
Nagai, H., & Kim, Y. H. (2017). Cancer prevention from the perspective of global cancer burden patterns. *Journal of Thoracic Disease, 9*, 448–451.
Österberg, M., Laine, J., Stenius, P., Kumpulainen, A., & Claesson, P. M. (2001). Forces between xylan-coated surfaces: Effect of polymer charge density and background electrolyte. *Journal of Colloid and Interface Science, 242*, 59–66.
Owens, D. E., 3rd, & Peppas, N. A. (2005). Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics, 307*, 93–102.
Peracchia, M. T., Fattal, E., Desmaële, D., Besnard, M., Noël, J. P., Gomis, J. M., et al. (1999). Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *Journal of Controlled Release, 60*, 121–128.
Ringot, C., Saad, N., Brégier, F., Bressollier, P., Poli, E., Chaleix, V., et al. (2018). Antibacterial activity of a photosensitive hybrid cellulose fabric. *Photochemical and Photobiological Sciences, 17*, 1780–1786.
Roy, I., Ohulchanskyy, T. Y., Pudavar, H. E., Bergey, E. J., Oseroff, A. R., Morgan, J., et al. (2003). Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: A novel drug-carrier system for photodynamic therapy. *Journal of the American Chemical Society, 125*, 7860–7865.
Saini, R. K., Chouhan, R., Bagri, L. P., & Bajpai, A. K. (2012). Strategies of targeting tumors and cancers. *Journal of Cancer Research Updates, 1*, 129–152.
Sternberg, E. D., Dolphin, D., & Brückner, C. (1998). Porphyrin-based photosensitizers for use in photodynamic therapy. *Tetrahedron, 54*, 4151–4202.
Stöber, W., Fink, A., & Bohn, E. (1968). Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range. *Journal of Colloid and Interface Science, 26*, 62–69.
Tamba, B. I., Dondas, A., Leon, M., Neagu, A. N., Dodi, G., Stefanescu, C., et al. (2015). Silica nanoparticles: Preparation, characterization and in vitro/in vivo biodistribution studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences, 71*, 46–55.
Yan, F., & Kopelman, R. (2003). The embedding of meta-tetra(hydroxyphenyl)-chlorin into silica nanoparticle platforms for photodynamic therapy and their singlet oxygen production and pH-dependent optical properties. *Photochemistry and Photobiology, 78*, 587–591.
Yan, T., Cheng, J., Liu, Z., Cheng, F., Wei, X., & He, J. (2017). pH-sensitive mesoporous silica nanoparticles for chemo-photodynamic combination therapy. *Colloids and Surfaces B. Biointerfaces, 161*, 442–448.
Zhu, A., Yuan, L., Jin, W., Dai, S., Wang, Q., Xue, Z., et al. (2009). Polysaccharide surface modified Fe3O4 nanoparticles for camptothecin loading and release. *Acta Biomaterialia, 5*, 1489–1498.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Zinc protoporphyrin IX derivatives bearing one or two adamantane groups: facile synthesis, encapsulation into cyclodextrin/cellulose nanocrystals complexes and phototoxic activity against HT-29 colorectal cancer cell line.

G.M.A. Ndong Ntoutoume, R. Granet, J. P. Mbakidi, L. Bretin, D. Y. Léger, B. Liagre, F. Brégier, V. Chaleix, V. Sol*

Université de Limoges, Laboratoire PEIRENE, EA 7500, 87000 Limoges cedex, France

E-mail author corresponding: vincent.sol@unilim.fr

Supporting information for this article is given via another document

Abstract: Four adamantane derivates protoporphyrin IX (PpIX) were tested as photodynamic therapy (PDT) agents in HT-29 colorectal cancer cell lines. In order to increase water-solubility and in vivo delivery, these photosentizers were easily incorporated in the hydrophobic cavity of cyclodextrins previously fixed on cellulose nanocrystals via electrostaitic interaction. All of these compounds exhibited excellent singlet oxygen quantum yield and shown a high in vitro PDT efficacy after illumination. This work demonstrated that the encapsulation of photosensitizers bearing adamantane moities on CD/CNCs complexes can improve PDT efficiency.

Introduction. Photodynamic therapy (PDT), also known as photochemotherapy or photoradiation therapy is an alternative experimental modality for the treatment of cancer. It is based upon the interaction between a photoactive drug and photons of visible light that results in the production of reactive oxygen species (ROS) and the subsequent destruction of tumor cell[1] .One of the benefits of this technique is that it does not lead to resistance phenomena. Protoporphyrin IX (PpIX) is a natural and commercially available photosensitizer (PS) has been chosen for this work because of its considerable potential for treating a wide variety of tumors[2,3]. However, PpIX, as well as many PS, is known to have a low selectivity and to be sparingly soluble in water. Nanotechnologies proved to be instrumental in designing tumor-targeted and water-soluble anticancer agents based on gold[4], iron oxide[5] silica[6], or organic polymer[7] nanoparticles. This article describes the building of a photosensitizer based on cellulose nanocrystals (CNCs), a biocompatible nanomaterial which has already been used for this purpose[8,9]. CNCs were prepared from cellulose microfibrils by sulfuric acid hydrolysis. This hydrolysis preferentially destroys the amorphous zones of cellulose microfibrils and leaves the crystalline regions as O-sulfated derivatives. These negatively charged nanoparticles were then complexed with positively charged cyclodextrin derivatives obtained from the functionalization of β–cyclodextrin with a quaternary ammonium. Cyclodextrin–CNCs ionic complexes were eventually loaded with mono- or di–adamantane–zinc–PpIX, thanks to the affinity of the hydrophobic cavity of cyclodextrin for apolar molecules. To evaluate the efficacy of the resulting nanobiomaterials and to validate the concept of vectorization by cellulose nanocrystals, in vitro bioassays were carried out against a colorectal cancer line (HT-29). Colorectal cancer (CRC) is considered the second most commonly occurring cancer in women and third most commonly occurring in men. In recent years, a rapid rise in colorectal cancer incidence and mortality has been observed in several developing countries[10]. A global increase of 60% of this malignancy incidence is expected by 2030[11]. Preliminary results allowed us to evaluate the ability of nanoparticles to penetrate cancer cells and to check that the photocytotoxic effects observed were attributable to the photosensitizers molecules delivered inside the cells. The synthesis of the adamantanyl protoporphyrin IX derivatives synthesis is presented in scheme 1.

Licence CC BY-NC-ND 3.0

Thérapie photodynamique (PDT) dans un modèle in vitro et in vivo de cancer colorectal : utilisation d'un photosensibilisateur nanovectorisé

Le cancer colorectal (CCR) est l'un des cancers les plus diagnostiqués dans le monde mais surtout le 2ème cancer le plus mortel. Malgré les progrès de la recherche médicale dans les traitements anticancéreux, de nombreux effets secondaires subsistent chez les patients ainsi que l'apparition de résistances aux traitements conventionnels. Le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses est donc nécessaire afin d'améliorer la prise en charge de ces patients. La thérapie photodynamique (PDT) utilisant des photosensibilisateurs (PS) se présente comme une stratégie thérapeutique innovante limitant fortement ces effets secondaires indésirables. La PDT a été approuvée pour le traitement de certains cancers grâce à la génération d'espèces réactives de l'oxygène cytotoxiques uniquement après photoactivation des PS. Cependant, une faible solubilité et un manque de sélectivité des PS vis à vis des sites tumoraux sont les principales limites en clinique. En effet, l'administration ciblée de médicaments est un point essentiel dans la thérapie anticancéreuse. La nanomédecine par l'utilisation de nanoparticules permet d'améliorer le ciblage tumoral car elles sont capables de s'accumuler spontanément dans les tumeurs solides grâce à l'effet de perméabilité et de rétention accrue. L'objectif de cette étude a été de démontrer l'intérêt de la vectorisation de la 5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine-xylane (TPPOH-X) sur des nanoparticules de silice (SNPs) afin d'augmenter l'efficacité anticancéreuse par un meilleur ciblage tumoral du traitement. Il a été démontré une augmentation significative de l'efficacité anticancéreuse des TPPOH-X SNPs-PDT grâce à l'amélioration de l'internalisation cellulaire par rapport à la TPPOH libre-PDT sur 3 lignées cellulaires de CCR humain. De plus, il a été caractérisé que la mort cellulaire induite par les TPPOH-X SNPs-PDT est dépendante de la voie apoptotique et que l'autophagie joue un rôle de résistance à la mort cellulaire. Par ailleurs, *in vivo* et en l'absence de toxicité, les TPPOH-X SNPs-PDT induisent une augmentation de l'efficacité anticancéreuse grâce à un meilleur ciblage tumoral par rapport à la TPPOH libre-PDT. Cette étude a donc permis de démontrer l'intérêt de la combinaison de la PDT et de la nanomédecine afin d'améliorer les futurs traitements anticancéreux.

Mots-clés : médicaments anticancéreux, porphyrines, nanoparticules de silice, administration de médicaments, thérapie photodynamique

Photodynamic therapy (PDT) in an *in vitro* and *in vivo* colorectal cancer model: use of a nanovectorized photosensitizer

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common cancer globally but above all the second leading cause of death for oncological reasons. Despite medical research advances in anti-cancer treatments, many side effects persist in patients as well as development of resistances to conventional treatments. The development of new anti-cancer therapeutic strategies is necessary in order to improve care of patients. Photodynamic therapy (PDT) using photosensitizers (PS) comes as an innovative therapeutic strategy severely restricting these undesirable side effects. PDT has been approved for treatment of some cancers due to the generation of cytotoxic reactive oxygen species only with photoactivated PS. However, low physiological solubility and lack of selectivity towards tumor sites are the main limitations of their clinical use. Indeed, targeted drug delivery is a crucial point in cancer therapy. Nanomedicine through the use of nanoparticles improves tumor-targeting because they are able to spontaneously accumulate in solid tumors through an enhanced permeability and retention effect. The purpose of this study was to prove added value of 5-(4-hydroxyphenyl)-10,15,20-triphenylporphyrin-xylan (TPPOH-X) vectorization by silica nanoparticles (SNPs) in order to enhance anti-cancer efficacy through better tumor-targeting. It has been demonstrated significant anti-cancer efficacy increase of TPPOH-X SNPs-PDT thanks to cellular uptake improvement relative to free TPPOH-PDT in 3 human CRC cell lines. Moreover, it has been characterized that cell death induced by TPPOH-X SNPs-PDT is conducted *via* apoptosis and autophagy acts as a resistance pathway to cell death. Furthermore, *in vivo* and without toxicity, TPPOH-X SNPs-PDT induce an elevated anti-cancer efficacy through improvement of tumor-targeting compared to free TPPOH-PDT. This study therefore highlighted the added value of PDT and nanomedicine combination in order to improve future cancer treatments.

Keywords: anticancer drugs, porphyrins, silica nanoparticles, drugs delivery, photodynamic therapy