



HAL
open science

Effets antiprolifératifs de photosensibilisateurs fonctionnalisés avec des complexes arène-ruthénium pour la thérapie photodynamique du cancer colorectal

Jacquie Massoud

► **To cite this version:**

Jacquie Massoud. Effets antiprolifératifs de photosensibilisateurs fonctionnalisés avec des complexes arène-ruthénium pour la thérapie photodynamique du cancer colorectal. Médecine humaine et pathologie. Université de Limoges, 2022. Français. NNT : 2022LIMO0110 . tel-04330340

HAL Id: tel-04330340

<https://theses.hal.science/tel-04330340v1>

Submitted on 8 Dec 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Limoges
ED 652 - Biologie, Chimie, Santé (BCS)
LABCiS, UR 22722, Faculté de Pharmacie

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges

Biologie, médecine et santé

Présentée et soutenue par

Jacque MASSOUD

Le 7 décembre 2022

**Effets antiprolifératifs de photosensibilisateurs fonctionnalisés
avec des complexes arène-ruthénium pour la thérapie
photodynamique du cancer colorectal**

Thèse dirigée par : M. Bertrand LIAGRE, Professeur des Universités, Université de Limoges,
France

Mme Mona DIAB-ASSAF, Professeur des Universités, Université
Libanaise, Liban

JURY :

Président du jury

M. Vincent SOL, Professeur des Universités, Université de Limoges, France

Rapporteurs

M. Ziad FAJLOUN, Professeur des Universités, Université Libanaise, Liban

M. Adrien ROSSARY, Maître de Conférences-HDR, Université Clermont Auvergne, France

Examineurs

M. Sayed ANTOUN, Professeur des Universités, Université Libanaise, Liban

M. Guillaume CHEMIN, Maître de Conférences, Université de Limoges, France



À ma famille

"Dream is not what you see in sleep, dream is that thing which doesn't let you sleep"

- A.P.J. Abdul Kalam-

Remerciements

À M. le Professeur Ziad FAJLOUN

Professeur des Universités

Université Libanaise - Faculté des Sciences 3 - Sciences biopharmaceutiques – Liban.

À M. le Docteur Adrien ROSSARY

Maître de Conférences-HDR

Université Clermont-Auvergne - UMR 1019, UCA-INRAE équipe ECREIN – France.

Je tiens à vous exprimer à tous les deux mes sincères remerciements pour me faire l'honneur de votre présence dans ce jury et d'accepter de juger mes travaux de thèse.

Je vous adresse ma profonde reconnaissance et tout mon respect.

À M. le Professeur Vincent SOL

Professeur des Universités

Université de Limoges, Faculté des Sciences et Techniques – Laboratoire LABCiS UR 22722 – France.

Je tiens à vous remercier tout d'abord pour m'avoir permis d'intégrer votre équipe au début de cette thèse. Je tiens également à vous remercier pour avoir accepté de présider ce jury.

À M. le Professeur Bertrand LIAGRE

Professeur des Universités

Université de Limoges, Faculté de Pharmacie – Laboratoire LABCiS UR 22722 – France.

Je tiens à vous remercier énormément pour la confiance que vous m'avez accordée durant ces années de thèse. Un grand merci pour tous vos conseils, vos encouragements et pour votre disponibilité à tout moment. Je tiens à vous adresser mes profonds remerciements pour votre soutien et votre engagement à me faire soutenir cette thèse malgré tous les problèmes vécus. Je suis vraiment honorée d'avoir eu l'opportunité d'être encadrée par une personne exceptionnelle comme vous. Soyez assuré Bertrand de toute ma reconnaissance et tout mon respect. Soyez sûr que vous serez toujours le bienvenu dans votre deuxième pays le Liban.

À Mme le Professeur Mona DIAB-ASSAF

Professeur des Universités

Université Libanaise - Faculté des Sciences 2 – Liban.

Je tiens à vous remercier pour la confiance que vous m'avez accordée durant cette thèse, ainsi que pour votre encouragement et votre soutien. Je tiens également à vous remercier pour m'avoir donné l'opportunité d'intégrer ce Laboratoire. Je vous adresse ma reconnaissance et tout mon respect.

À M. le Professeur Sayed ANTOUN

Professeur des Universités

Université Libanaise - Faculté des Sciences 3 – Liban.

Je tiens à vous remercier tout d'abord de me faire l'honneur d'accepter d'examiner mes travaux de thèse et d'être membre de ce jury.

Pr. Sayed ... tout a commencé après notre rencontre à la reprographie de la Faculté des Sciences 3. Cette rencontre qui a marqué ma vie, lorsque vous m'avez proposé d'être votre thésarde. Je vous remercie sincèrement de m'avoir accordé votre confiance pour débiter cette thèse. Au plus haut point, je vous remercie pour votre compréhension, parce que pour vous mon diplôme a été en priorité avant tout. Je tiens à vous remercier également pour toutes nos belles discussions sur les plans scientifique et personnel et particulièrement durant nos longs trajets de Zgharta à Beirut, cela m'a vraiment manqué. Soyez assuré Pr. Sayed de ma profonde reconnaissance et de tout mon respect.

À M. le Docteur Guillaume CHEMIN

Maître de Conférences

Université de Limoges, Faculté de Pharmacie - Laboratoire LABCiS UR 22722 – France

Je tiens à vous remercier de me faire l'honneur d'être membre de ce jury et d'accepter d'examiner mes travaux de thèse. Je vous exprime ma profonde reconnaissance et tout mon respect.

À M. le Professeur Bruno THERRIEN

Professeur des Universités

Université de Neuchâtel – Institut de Chimie – Suisse.

Je tiens à vous remercier pour la synthèse des complexes PS-arène-Ru au sein de votre Laboratoire. Je vous exprime tout mon respect.

À M. le Docteur Manuel GALLARDO-VILLAGRAN

Manuel, je tiens à te remercier pour la synthèse des complexes PS-arène-Ru testés dans ce projet. Cela a été un plaisir de faire ta connaissance.

À M. Pr. Jean-Luc DUROUX

Professeur des Universités

Université de Limoges, Faculté de Pharmacie - Laboratoire LABCiS UR 22722 – France

Pr. Duroux, malgré que nous n'ayons pas eu l'occasion de travailler ensemble, je tiens à vous remercier pour votre sourire chaque jour qui a été vraiment pour moi une source d'encouragement et de motivation quotidienne. Je vous adresse tout mon respect.

À M. le Docteur David Yannick LEGER

Maître de Conférences

Université de Limoges, Faculté de Pharmacie Laboratoire LABCiS UR 22722 – France

Je tiens à vous exprimer ma sincère gratitude d'avoir fait votre connaissance.

À Mme Aline PINON

Aline !! je te remercie vivement pour ta forte implication et ton investissement dans mes travaux de thèse. Un grand merci également pour ta disponibilité à tout moment durant ces années de thèse, pour toutes tes connaissances techniques, tes conseils, et surtout tes corrections. Cela a été un grand plaisir de travailler avec toi. Tu vas sûrement me manquer.

À Mme Frédérique MARTIN

Je te remercie Fred pour nos échanges, cela a été un plaisir de faire ta connaissance.

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

Je tiens à remercier sincèrement, **Mme Catherine OUK** et **Mme Claire CARRION**, pour leur gentillesse et leurs nombreuses heures d'analyse en cytométrie en flux et en microscopie confocale passées tout au long de ma thèse.

Aux doctorants du Laboratoire

À Lucie, Hind et Valentin, je vous remercie pour tous nos moments d'échanges ensemble, cela a été un plaisir de faire votre connaissance.

À Suzan et Rayan, je vous remercie sincèrement pour tous vos encouragements ainsi que pour votre présence au quotidien. Même si cela a été pour quelques mois ensemble dans ce Laboratoire soyez sûres que vous m'avez créé les plus beaux souvenirs.

À Layla, je te remercie pour cette amitié durant ces années à Limoges. Un grand merci également pour tous nos beaux moments et souvenirs. En espérant revenir un jour dans un futur proche à Limoges et prendre notre café particulier sur le banc de la résidence La Borie : P.

À vous tous je vous souhaite une bonne continuation.

À mes amis libanais à Limoges

À Zeina, je te remercie pour cette amitié, pour ta confiance et pour ta belle personnalité. Je te remercie également pour tous nos moments ensemble.

À Roy, Nader, Ali et Mroué, je vous remercie pour tous ces souvenirs et ces beaux moments ensemble.

À tous les compatriotes libanais à Limoges : Layla, Nader, Ali, Roy, Zeina, Suzan et Rayan merci pour avoir été ma deuxième famille à Limoges.

À ma famille

Comme je suis chanceuse d'être un membre de cette famille !!! Toutes les expressions du monde seront insuffisantes pour vous décrire mon énorme remerciement. Je vous remercie pour votre présence dans ma vie, pour votre encouragement illimité et pour votre soutien.

À mes neveux et nièces, je vous aime jusqu'à l'infini !!!!

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/>



Table des matières

Remerciements	3
Droits d'auteurs	7
Table des matières	8
Listes des abréviations	11
Introduction bibliographique	16
Chapitre I. Cancer colorectal	17
I.1. Le gros intestin	17
I.2. Vascularisation du gros intestin	20
I.3. Histologie du gros intestin	21
I.4. Rôles du gros intestin	22
I.5. Les pathologies du côlon	23
I.5.1. Le syndrome du côlon irritable	23
I.5.2. Les diverticuloses et diverticulites du côlon	23
I.5.3. Les maladies inflammatoires chroniques	24
I.6. Le cancer colorectal	26
I.6.1. Épidémiologie du cancer colorectal	26
I.6.2. Survie et délai de guérison du cancer colorectal	28
I.6.3. Les facteurs de risque du cancer colorectal	28
I.6.4. Dépistage du cancer colorectal	29
I.6.5. Personnes à risque moyen de cancer colorectal	30
I.6.6. Personnes à risque élevé de cancer colorectal	30
I.6.7. Personnes à risque potentiellement très élevé de cancer colorectal	31
I.6.8. La polypose adénomateuse familiale	31
I.6.9. Syndrome de Lynch	31
I.7. Physiopathologie du cancer colorectal	32
I.7.1. Les polypes adénomateux	32
I.7.2. Les polypes non néoplasiques	33
I.8. Diagnostic et classification du cancer colorectal	34
I.8.1. Le diagnostic clinique	34
I.8.2. Diagnostic par coloscopie	35
I.8.3. Diagnostic par des analyses biochimiques et anatomopathologiques	36
I.9. Classification TNM	36
I.10. Traitements	44
I.10.1. Méthodes conventionnelles	44
I.10.2. Les approches avancées pour traiter le cancer du côlon	49
Chapitre II. Thérapie photodynamique	52
II.1. Principe de la thérapie photodynamique	52
II.2. Les mécanismes de la PDT	53
II.3. Les mécanismes photophysiques et photochimiques de la PDT	55
II.3.1. Les réactions photochimiques de type I	58
II.3.2. Les réactions photochimiques de type II	58
II.4. Le photoblanchiment ou la photomodification des PS	59

II.5. Les Photosensibilisateurs.....	59
II.5.1. Caractéristiques importantes des PS.....	60
II.5.2. Structures principales des PS.....	62
II.5.3. Pharmacocinétique des PS.....	69
II.5.4. Biodistribution des PS.....	70
II.6. Ciblage tumoral.....	71
II.7. Vectorisation : solution pour la résistance et les limitations de la PDT.....	72
II.8. PDT pour les traitements des CCR.....	73
Chapitre III. Mécanismes d'action de la PDT.....	75
III.1. Lésions moléculaires induites par la PDT.....	75
III.1.1. Réactions de type I.....	75
III.1.2. Réactions de type II.....	76
III.2. Lésions cellulaires induites par la PDT.....	77
III.2.1. Lésions aux niveaux des organelles cellulaires.....	78
III.3. La mort cellulaire.....	79
III.3.1. Nécrose.....	80
III.3.2. Apoptose.....	81
III.3.3. Caspases et mort cellulaire.....	81
III.4. Voies de signalisations apoptotiques.....	84
III.4.1. Voie de mort cellulaire intrinsèque ou mitochondriale.....	84
III.4.2. La voie extrinsèque de l'apoptose.....	85
III.5. Autophagie.....	86
III.6. PDT et voies de mort cellulaire.....	88
Chapitre IV. Ruthénium et applications anticancéreuses.....	89
IV.1. PS à base de métaux.....	89
IV.2. Ruthénium pour la thérapie anticancéreuse.....	90
IV.3. Activité antitumorale du Ru et ses dérivés.....	91
IV.4. Potentialité des composés du Ru comme médicaments perspective.....	92
IV.5. PS conjugué au Ru pour la PDT.....	93
IV.6. Complexes d'arène-Ru aux propriétés antitumorales.....	94
IV.7. Les assemblages métalliques comme système de vectorisation.....	95
IV.8. Cages métalliques à base d'arène-Ru.....	96
Projet de recherche.....	101
Matériels et méthodes.....	103
Chapitre I. Expérimentations <i>in vitro</i>	104
I.1. Matériels.....	104
I.2. Synthèse et application de TPyP et Zn-TPyP-arène-Ru.....	104
I.3. Lignées cellulaires et culture.....	104
I.4. Traitements et irradiations.....	105
I.5. Étude de la viabilité cellulaire.....	105
I.6. Dosage du taux cellulaire des espèces réactives de l'oxygène.....	106
I.7. Étude de l'internalisation et de la localisation cellulaire.....	106
I.8. Analyse du cycle cellulaire.....	107
I.9. Analyse de l'expression des protéines.....	107
I.9.1. Extraction des protéines.....	107

I.9.2. Expression des protéines	108
I.10. Étude de la mort cellulaire.....	108
I.10.1. Analyse multiparamétrique de l'apoptose par marquage à l'annexine V et l'iodure de propidium	109
I.10.2. Analyse quantitative des caspases-3/-7 activées	109
I.10.3. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN.....	110
I.11. Analyses statistiques	110
Partie expérimentale.....	111
Chapitre I. Expérimentations in vitro.....	112
I.1. Étude de la viabilité cellulaire	112
I.2. Dosage du taux cellulaire d'espèces réactives de l'oxygène.....	115
I.3. Étude de l'internalisation cellulaire	116
I.4. Analyse du cycle cellulaire	124
I.5. Étude du niveau d'apoptose	126
I.5.1. Analyse quantitative des caspases-3/-7 activées.....	129
I.5.2. Expression protéique de marqueurs apoptotiques	132
I.5.3. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN	137
Discussion	140
Conclusion et perspective	146
Références bibliographiques.....	151
Table des illustrations.....	169
Table des tableaux	173
Publication.....	174

Listes des abréviations

5-ALA : Acide 5-aminolévulinique

5-FU : 5-fluorouracile

A

A1 : Bcl-2-related protein A1

ABTS : Acide 2,2'-azino-bis(3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique)

ACE : Antigène carcino-embryonnaire

ADN : Acide désoxyribonucléique

AIF : Apoptosis Inducing Factor

AKT : Protéine kinase B

ALA-D : Acide delta-aminolévulinique déshydratase

ALA-S: Acide delta-aminolévulinique synthase

APAF1: Apoptotic protease activating factor 1

APC: Adenomatous polyposis coli

ARN: acide ribonucléique

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adénosine triphosphate

B

BAK: Bcl-2 homologous Antagonist/Killer

BAX: Bcl-2 Associated X

BCL-2: B-cell lymphoma-2

BCL-XL: B-cell lymphoma-extra large

BID: BH3 Interacting Domain Death Agonist

BIM: Bcl-2 Interacting Mediator of cell death

BSA : albumine de sérum bovin

C

CARD : Caspase activation and recruitment domain

CARD15 : Caspase recruitment domain-containing protein 15

CCAAT: (cytosine-cytosine-adenosine-adenosine-thymidine) enhancer-binding proteins

CCR: Cancer colorectal

Ce6 : Chlorine e6

CIRC : Centre international de recherche sur le Cancer

CPO: Coproporphyrinogène-oxydase

CRISPR-Cas9: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats –caspase-9

D

DALM: Dysplasia Associated Lesion or Mass

DCF: 2',7'-dichlorofluorescéine

DCFDA: 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate

DED : Death effector domain

DEVD : Motif spécifique pour le clivage de caspase-3

DISC: Death inducing signaling complex

DLG5: Disks large homolog 5

DMEM: Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO: Diméthylsulfoxyde

DR4 : Récepteur de mort 4

DR5 : Récepteur de mort 5

E

EBRT: External beam radiation therapy

EGF: Facteur de croissance épidermique

EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique

EPR : Effet de perméabilité et de rétention accru

Erb8: Erythroblastosis oncogene B

ERK: Extracellular signal Related Kinase

ERO : Espèces réactives de l'oxygène

F

FADD: Fas-associated death domain

Fas/CD95: Cell Surface Death Receptor

FCH: Ferrochelatase

FITC : Isothiocyanate de fluorescéine

H

HBO₂: Oxygénothérapie hyperbare
HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HER : Facteur de croissance épidermique humain
HNPCC: Hereditary non-polyposis colon cancer
HpD: Hematoporphyrin derivative
HRP: Peroxydase de raifort

I

IBD: Inflammatory Bowel Disease
IC₅₀: Concentration inhibitrice médiane
IP : Iodure de propidium

J

JAK: Janus Kinase

K

KP1019: Imidazolium trans-bis(1H-indazole)

L

LDL: Low Density Lipoproteins

M

MCL-1: Myeloid Cell Leukemia-1
MEK: Mitogen-activated extracellular signal-regulated protein kinase
MICI : Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
miRNA: Micro-ARN
MMR: Mismatch Repair
MOMP : Perméabilisation de la membrane externe des mitochondries
MSI : Instabilité microsatellitaire
mTOR : Mechanistic target of rapamycin
MTT : 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium bromide
MUTYH : MutY DNA glycosylase

N

NAMI-A: Imidazolium trans-diméthylsulfoxyde-imidazole-tétrachlororuthénate

NF-kB: Nuclear factor kappa B

NIR: Near infra-red

NOD2: Nucleotide-binding oligomerization domain 2

NOXA: Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1

O

OCTN: small subfamily of membrane transport proteins

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

P

PAF : Polypose adénomateuse familiale

PARP : Poly(ADP-ribose)-polymérase

PBG-D : Porphobilinogène désaminase

PBS : Tampon phosphate salin

PD : Photodiagnostic

PDD : Diagnostic photodynamique

PDT : Thérapie photodynamique

PI3K: Phosphoinositide 3-kinase

PpIX: Protoporphyrine IX

PPO : Protoporphyrinogène oxydase

PS : Photosensibilisateur

Pt : Platine

PTT: Thérapie photothermique

PUMA: p53 upregulated modulator of apoptosis

PVA : Alcool polyvinylique

PVDF : Polyfluorure de vinylidène

R

RAF: Rapidly accelerated fibrosarcoma

RAS: Rat Sarcoma

RE : Réticulum endoplasmique

RPMI : Roswell Park Memorial Institute Medium

Ru : Ruthénium

S

SCI : Syndrome du côlon irritable

SEM : Erreur type de la moyenne

siRNA: Petit ARN interférent

SIRT: Selective interne radiotherapy

SOD: superoxyde dismutase

STAT-3: Signal transducer and activator of transcription 3

SVF : Sérum de veau fœtal

T

TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse

TGF- β : Facteur de croissance transformant-alpha

TGF- α : Facteur de croissance transformant-beta

TNFR: Tumor necrosis factor receptor

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

TPyP: Tétrapyridylporphine

TRAIL: Tumor-necrosis-factor related apoptosis inducing ligand

U

UCS : Uroporphyrinogène synthase

UGD : Uroporphyrinogène décarboxylase

V

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

W

WB: Western Blot

Z

Zn-TPyP : Zinc-tétrapyridylporphine

Introduction bibliographique

Chapitre I. Cancer colorectal

I.1. Le gros intestin

Le côlon constitue la partie terminale de l'appareil digestif de calibre supérieur à celui de l'intestin grêle, dont il est le prolongement et qu'il encadre extérieurement. Il mesure environ 5 à 8 cm de largeur et 100 à 150 cm de longueur. Il débute après la valvule iléocœcale pour se terminer par l'anus (**Figure 1**) [1].

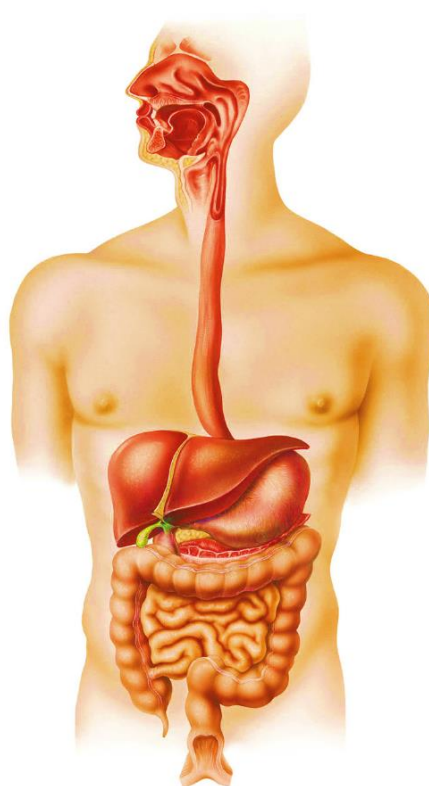


Figure 1 : Localisation du gros intestin chez l'être humain [2]

Le côlon comprend plusieurs parties : le cœcum, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant, le côlon sigmoïde et le rectum.

- Le cœcum

C'est la partie initiale du gros intestin, dans le côlon ascendant, située au niveau de la fosse iliaque droite. A l'intérieur du cœcum existe la valvule iléocœcale ou valvule de Bauhin, cet orifice iléocœcal assure la communication entre l'iléon de l'intestin grêle et le côlon.

Sa forme est celle d'une grande poche, connue également sous le nom de l'ampoule cæcale dans laquelle sont stockés les restes alimentaires arrivant de l'iléum (**Figure 2**).

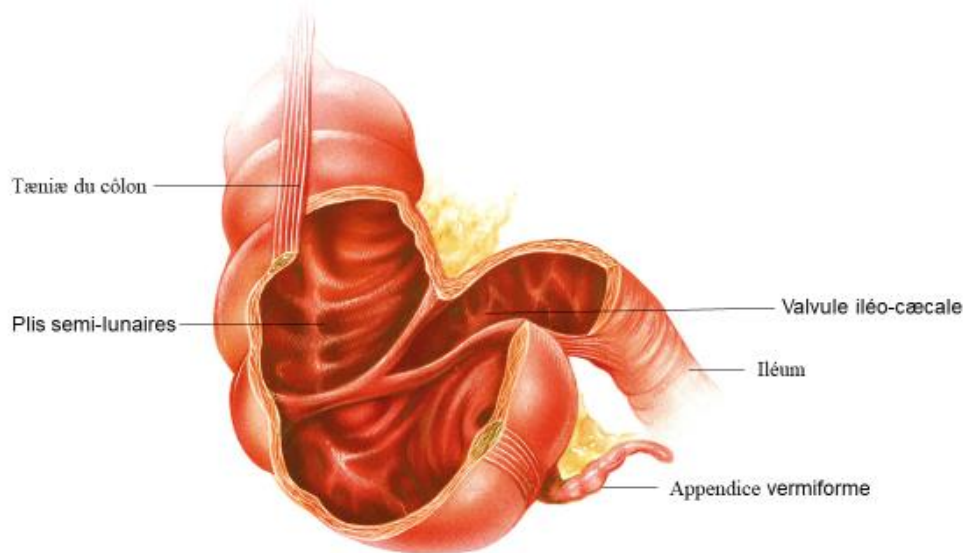


Figure 2 : Organisation du cæcum [2]

- Le côlon ascendant

Connu aussi sous le nom de côlon droit, il parcourt verticalement le flanc droit de l'abdomen sur 15 à 20 cm depuis le cæcum jusqu'au voisinage du foie, où il présente une angulation appelée "angle hépatique" du côlon d'où se prolonge ensuite le côlon transverse. Seule sa partie antérieure est recouverte par le péritoine, tandis que sa face postérieure s'appuie directement contre la paroi abdominale. Cette partie du côlon est légèrement mobile.

- Le côlon transverse

C'est la partie intermédiaire du gros intestin qui s'étend sur 24 à 40 cm dans la partie supérieure de l'abdomen entre l'angle hépatique à l'hypocondre droit et l'angle hépatique à l'hypocondre gauche. Le côlon transverse est le prolongement du colon ascendant, il parcourt l'abdomen dans le sens transversal de droite à gauche. Contrairement aux deux autres côlons, dont la forme intérieure est circulaire, le côlon transverse prend une forme triangulaire. Il comporte une série d'anneaux correspondant aux plis semi-lunaires ou les crêtes du côlon, entre lesquelles se trouvent les haustrations coliques. Il est recouvert à l'avant et à l'arrière par le péritoine. Sur sa face postérieure apparaît une cloison membraneuse appelée *mésocôlon* qui relie le côlon transverse à la couche péritonéale tapissant la paroi postérieure de l'abdomen.

- Le côlon descendant

C'est une partie du gros intestin qui descend verticalement du côté gauche de l'abdomen sur une longueur de 15 à 20 cm avant le rectum. Il parcourt ce côté de l'abdomen depuis l'angle splénique du côlon où il rejoint le côlon transverse jusqu'au côlon sigmoïde. Sa face postérieure

est fixée directement à la paroi abdominale, alors que le reste est recouvert par le péritoine. Par contre sa face terminale est fixée par un ligament à la paroi de la cavité pelvienne.

- Le côlon sigmoïde

Il fait suite au colon descendant lorsque celui-ci pénètre dans la cavité pelvienne. Il se poursuit par le rectum en arrière de la vessie. Ce segment a une forme de "S" souvent d'un calibre plus petit que les autres parties du gros intestin et de longueur variable de 15 à 50 cm. Sa forme est très variable d'un individu à l'autre et il est doté d'une forte mobilité ce qui rend possible sa torsion.

- Le rectum

Partie terminale du gros intestin, il s'étend de 12 à 15 cm de l'anus à l'angle recto-sigmoïdien. Le rectum prolonge le côlon sigmoïde vers le bas et s'introduit dans la cavité pelvienne. Il s'agit d'un organe extra-péritonéal ou rétropéritonéal, car il sort du péritoine et se situe en arrière de la vessie. Sa partie terminale est dilatée et nommée ampoule rectale, lieu de stockage de la matière fécale déjà formée. Il est entouré par des muscles de l'anus qui en se contractant facilitent la défécation (**Figure 3**) [3] [4].

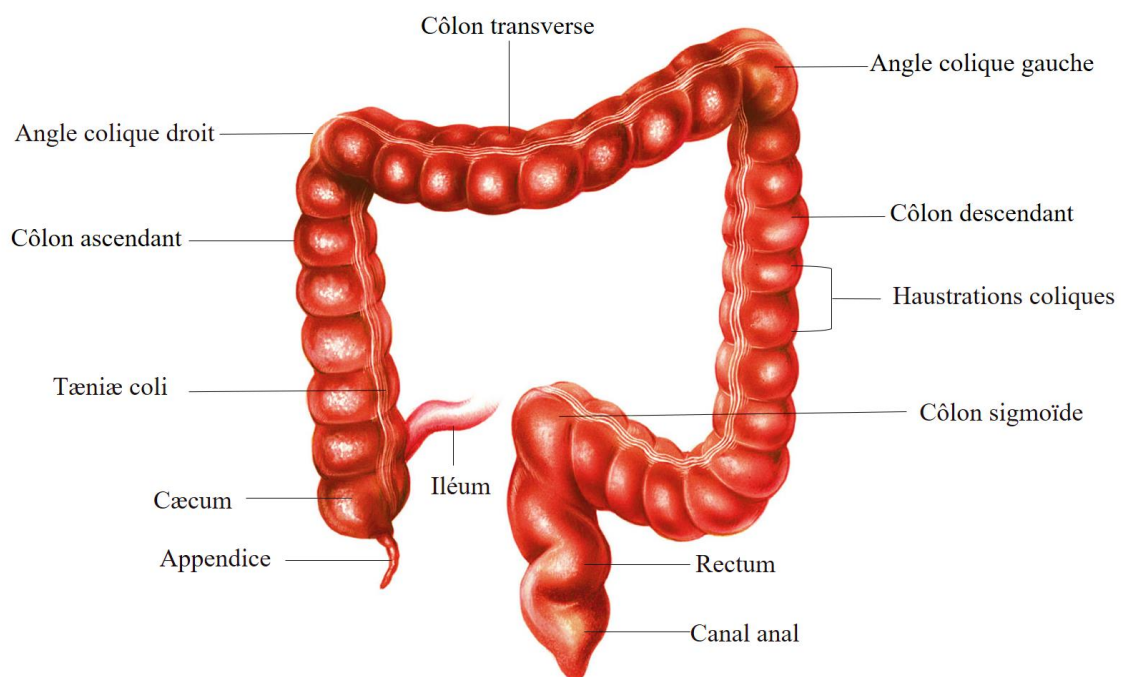


Figure 3 : Organisation du côlon [2]

Le tube digestif se termine par l'anus, un canal de longueur de 2 à 3 cm qui prolonge l'extrémité inférieure du rectum jusqu'à l'orifice anal relié à la peau. Il est formé de sphincters ou valvules anales internes et externes avec un système musculaire rendant cette zone à haute pression dans le but de l'expulsion du bol fécal (**Figure 4**).

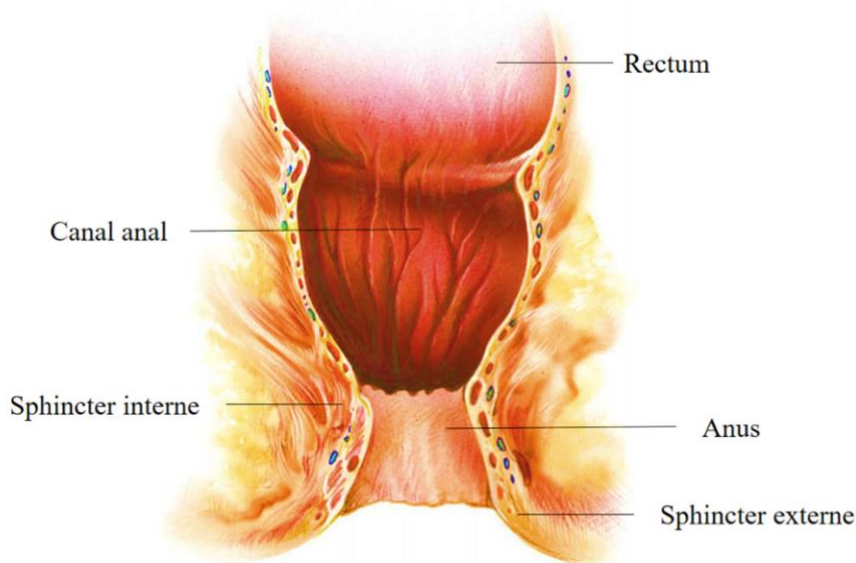


Figure 4 : Organisation de la dernière partie du tube digestif [2]

I.2. Vascularisation du gros intestin

Comme n'importe quel organe du corps, le gros intestin est bien vascularisé et innervé.

Le côlon droit, du cæcum au colon transverse, est vascularisé par les branches de l'artère mésentérique supérieure issue de l'aorte, alors que le côlon gauche et le sigmoïde sont vascularisés par l'artère mésentérique inférieure issue de l'aorte. Le côlon transverse, se situant entre les artères mésentériques supérieure et inférieure, bénéficie des deux apports artériels. Le rectum est irrigué par l'artère rectale supérieure issue de l'artère mésentérique inférieure et par les artères rectales moyennes et inférieures issues des artères iliaques internes. Généralement, les veines suivent les artères, les veines mésentériques supérieures et inférieures se drainent dans la veine porte vers le foie.

Le réseau lymphatique accompagne les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques abdominaux traversent le mésentère vers la grande citerne et ensuite le canal thoracique. Il faut bien noter que les vaisseaux lymphatiques du rectum et de l'anus drainent vers les ganglions des régions iliaques et inguinales.

L'innervation extrinsèque du gros intestin est dépendante des fibres parasympathiques et sympathiques, efférentes comme afférentes, souvent reliées au système nerveux central spécialement l'hypothalamus [4].

I.3. Histologie du gros intestin

Comme les autres organes du tube digestif, la paroi du côlon est constituée de différentes couches structurales :

a- La muqueuse

La muqueuse du côlon fait face à la lumière, c'est une couche qui recouvre tout l'intérieur du gros intestin. Elle est beaucoup plus lisse que la couche de l'intestin grêle, elle présente de nombreuses saillies aplaties appelées aussi des cryptes. La couche superficielle est composée d'un épithélium cylindrique simple qui se polystratifie au niveau du canal anal. L'épithélium colique est constitué de plusieurs cellules comme les colonocytes qui jouent un rôle important dans l'absorption colique ; les cellules caliciformes ou les cellules à mucus qui forment les glandes caliciformes du gros intestin, responsables de la sécrétion du mucus dans la lumière de l'intestin. Cette sécrétion contribue à la formation et à la lubrification du bol fécal qui devient de plus en plus solide durant le transit, et à la protection de la muqueuse.

La sous-muqueuse : c'est un prolongement de la couche sous-muqueuse de l'intestin grêle, elle est constituée d'un tissu conjonctif qui contient les glandes de Lieberkhün. La tunique sous-muqueuse inclut également une muqueuse musculaire aux fibres musculaires lisses appelée la *muscularis mucosae*. Elle inclut de nombreuses terminaisons vasculonerveuses, on y trouve les vaisseaux sanguins, les vaisseaux lymphatiques et les nerfs comme notamment le plexus sous-muqueux de Meissner.

b- La musculuse

La couche musculuse du gros intestin est constituée de deux couches externe et interne. La couche interne est faite de fibres musculaires disposées dans le sens circulaire semblables à des anneaux et qui recouvrent tout le périmètre intestinal. Ces fibres musculaires sont des génératrices de contractions phasiques mixant et propulsant le contenu du côlon. Des contractions éparses de ces fibres circulaires peuvent aussi générer des contractions annulaires prolongées formant des sacculations appelées haustrations. Cette strate musculaire est relativement très fine.

La couche musculaire externe du côlon est particulière puisqu'elle ne réalise pas une couverture continue de l'organe. Elle est formée par des fibres musculaires disposées dans le sens longitudinal regroupées en trois bandes appelées *ténias* ou *bandelettes*.

c- La séreuse

C'est la couche la plus externe du côlon, elle est formée d'un tissu conjonctif et mésothélial enveloppant extérieurement le gros intestin et faisant partie de la couche péritonéale qui recouvre ce dernier. La membrane séreuse ne recouvre qu'en partie les zones situées à l'extérieur du péritoine comme le côlon ascendant, le côlon descendant et le rectum.

A la surface extérieure du côlon, on retrouve notamment des petits sacs graisseux appelés appendices épiploïques qui peuvent se compliquer pour évoquer des diverticulites ou des appendagites (**Figure 5**) [2][5] .

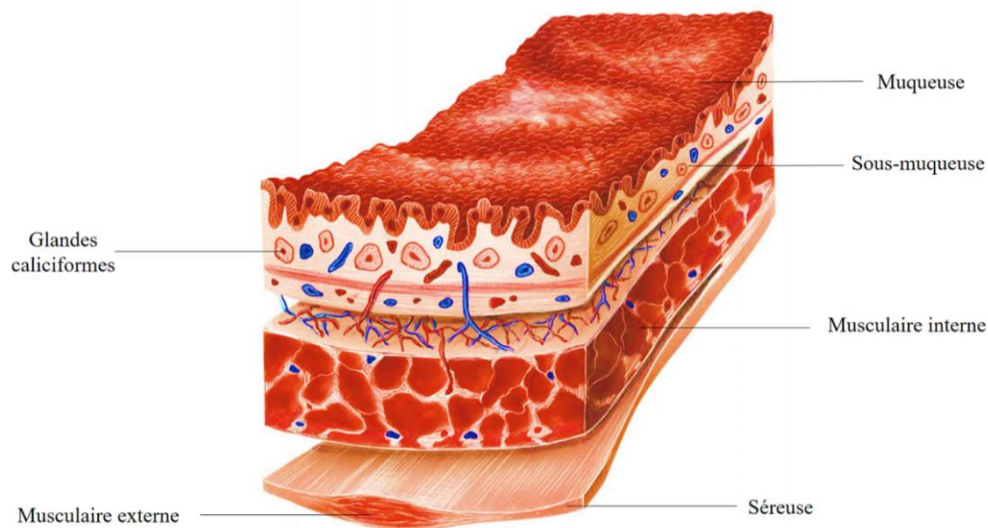


Figure 5 : Histologie du côlon [2]

I.4. Rôles du gros intestin

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. En effet, le côlon reçoit de l'intestin grêle de 1 à 2 litres de chyme par jour, ce liquide contient de l'eau et des électrolytes ainsi qu'une certaine quantité de nutriments non absorbés tels que les fibres. Les repas passent du petit au grand intestin dans les 8 à 9 heures suivant l'ingestion. L'intestin grêle aura absorbé environ 90% de l'eau ingérée. Le gros intestin absorbe la majeure partie de l'eau restante, un processus qui convertit les résidus de chyme liquide en selles semi-solides ou matières fécales. L'absorption colique qui survient surtout au niveau du côlon droit est favorisée par la motricité de brassage et les mouvements de va-et-vient de cette partie du côlon. Les matières fécales seront ensuite transmises au rectum afin d'être évacuées par l'anus. Le gros intestin absorbe également autre que l'eau les électrolytes. Les ions sodium sont activement absorbés par l'action de la pompe sodium/potassium ; cela déplace les ions sodium et potassium dans des directions opposées à travers les membranes cellulaires, favorisant leur absorption. En effet, sur 500 mL de résidus alimentaires qui pénètrent dans le cæcum chaque jour, environ 150 mL se transforment en selles. Celles-ci contiennent principalement des bactéries, des cellules épithéliales de la muqueuse intestinale, des déchets inorganiques, des matières alimentaires non digérées et des fibres, ainsi que de l'eau pour faciliter leur passage

dans le tractus gastro-intestinal. Elles contiennent également de petites quantités de graisses et de protéines. Leur couleur brune caractéristique est due à la présence de stercobiline et d'urobiline, produits par la dégradation de l'hémoglobine des vieux globules rouges. Les matières fécales sont également ramollies par les fibres alimentaires. Le mucus, sécrété par les cellules caliciformes tapissant tout le côlon, aide à lier le chyme déshydraté et lubrifie également le passage des matières fécales. Le transit dans le côlon est lent : il faut trois jours pour éliminer 70% d'un repas et l'expulsion complète de tous les restes peut prendre jusqu'à une semaine [4] [6].

I.5. Les pathologies du côlon

Le côlon est un des organes du corps humain le plus susceptible à de multiples pathologies. Ces maladies sont divisées en deux groupes : premièrement les pathologies bénignes comme le syndrome du côlon irritable, la diverticulose du côlon, et les maladies inflammatoires chroniques regroupant la colite ulcéreuse et la maladie du Crohn. Deuxièmement, les pathologies malignes correspondant aux tumeurs colorectales.

I.5.1. Le syndrome du côlon irritable

Le syndrome du côlon irritable (SCI) est un problème multifactoriel complexe causé par une dérégulation entre le cerveau et l'intestin. Il comporte des éléments d'anomalies motrices et sensorielles intestinales qui pourraient être associées à des causes post-inflammatoires, génétiques et psychologiques. Le syndrome du côlon irritable se traduit par divers symptômes fonctionnels gastro-intestinaux comme des douleurs abdominales récurrentes, des changements dans les habitudes intestinales, de la diarrhée ou de la constipation, des ballonnements et une urgence de la défécation. On classifie le syndrome du côlon irritable en fonction des symptômes selon lesquels la constipation ou bien la diarrhée prédomine, ou encore s'il y a alternance entre diarrhée et constipation. Le symptôme le plus marquant est la douleur abdominale récurrente soulagée par la défécation. Sa prévalence dans la population générale se situant entre 10% et 15%, le SCI représentant l'un des troubles fonctionnels gastro-intestinaux les plus communs dans le monde [7].

I.5.2. Les diverticuloses et diverticulites du côlon

La diverticulose est une anomalie anatomique du côlon le plus souvent asymptomatique, fréquente chez le patient âgé. Elle peut être prévenue par une bonne hygiène de vie. Cette pathologie est caractérisée par la présence de diverticules ou de hernies dans la muqueuse et la sous-muqueuse résultant d'un défaut survenu au niveau de la couche musculuse. Les diverticules peuvent être détectés à gauche et à droite du côlon. Les diverticules gauches sont

des pseudo-diverticules car la hernie ne traverse pas toutes les couches du côlon, tandis que la diverticulose survenant dans le côlon droit est caractérisée par de vrais diverticules, avec une hernie de toutes les couches coliques.

La diverticulite colique est une maladie gastro-intestinale douloureuse se produisant de manière imprévisible et pouvant entraîner des symptômes gastro-intestinaux chroniques.

La diverticulite est une inflammation des diverticules liée à une infection. La diverticulite peut être simple ou compliquée. La diverticulite non compliquée implique un épaissement de la paroi du côlon et des changements inflammatoires péricoliques. La diverticulite compliquée comprend en outre la présence d'un abcès, d'une péritonite, d'une obstruction, d'un rétrécissement et/ou d'une fistule. Seuls 12% des patients atteints de diverticulite présentent une maladie compliquée. La diverticulite, aux manifestations douloureuses, est traitée par antibiotiques. Les complications les plus graves de ces deux pathologies peuvent nécessiter une intervention chirurgicale (**Figure 6**) [8] [9] [10].

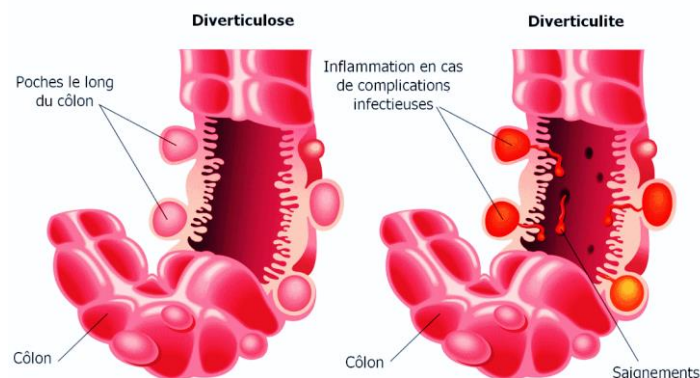


Figure 6 : Diverticulose et diverticulite du gros intestin [11]

I.5.3. Les maladies inflammatoires chroniques

Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) selon l'appellation française ou Inflammatory Bowel Disease (IBD) selon l'appellation anglaise se traduisent par un trouble inflammatoire du tractus gastro-intestinal qui a un impact considérable sur la qualité de vie. Les causes de l'inflammation dans les MICI restent inconnues, mais impliqueraient une réponse immunitaire hypersensible au microbiote intestinal. Les maladies inflammatoires chroniques désignent deux maladies apparentées, la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn.

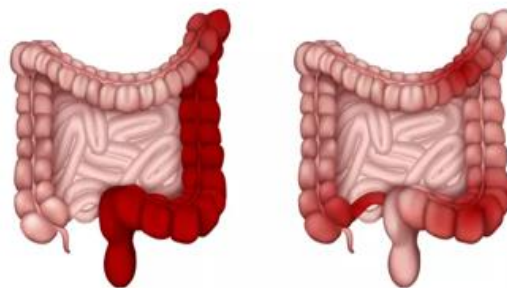
La colite ulcéreuse ou rectocolite hémorragique est une maladie inflammatoire chronique affectant le côlon, et son incidence est en augmentation dans le monde. Cette pathologie affectant le plus souvent les adultes âgés de 30 à 40 ans est multifactorielle, impliquant une

prédisposition génétique, des défauts de la barrière épithéliale, des réponses immunitaires dérégulées et des facteurs environnementaux. Les patients atteints de rectocolite hémorragique présentent une inflammation des muqueuses commençant dans le rectum et pouvant s'étendre de façon continue aux segments proximaux du côlon. La colite ulcéreuse se présente généralement avec une diarrhée sanglante et peut être diagnostiquée par une coloscopie et des résultats histologiques. Le but de la prise en charge est d'induire puis de maintenir la rémission, définie comme la résolution des symptômes et la guérison endoscopique. Les traitements de la colite ulcéreuse comprennent les médicaments à base d'acide 5-aminosalicylique, les stéroïdes et les immunosuppresseurs.

La maladie de Crohn est une maladie inflammatoire chronique du tractus gastro-intestinal, avec une incidence croissante dans le monde. Cette pathologie apparaît à un âge jeune, avec un pic de fréquence de diagnostic se situant autour de 30 ans. A l'inverse de la colite ulcéreuse qui est plus fréquente chez l'homme, la maladie de Crohn est prédominante chez la femme. De même, dans la maladie de Crohn, l'inflammation s'infiltré dans la paroi intestinale musculaire et est très souvent distribuée d'une manière discontinue au niveau du côlon, tandis que dans la colite ulcéreuse, la maladie se limite à la surface de la muqueuse donnant une inflammation continue du côlon. La maladie de Crohn pourrait résulter d'une interaction complexe entre la susceptibilité génétique (10%) notamment une mutation au niveau du gène NOD2 ou CARD15, qui est impliqué dans l'immunité innée, ou l'implication des gènes OCTN et DLG5 dont leurs rôles ne sont pas encore connus, les facteurs environnementaux et le microbiote intestinal altéré, conduisant à des réponses immunitaires innées et adaptatives dérégulées. Le scénario clinique typique est celui d'un patient présentant des douleurs abdominales, une diarrhée chronique, une perte de poids et de la fatigue. L'évaluation de l'étendue de la maladie et des facteurs pronostiques des complications est primordiale pour guider les décisions thérapeutiques. Les stratégies actuelles visent une rémission profonde et durable, dans le but de prévenir les complications, telles que la chirurgie, et le blocage de la progression de la maladie.

L'une des conséquences les plus importantes de la colite ulcéreuse chronique ou de la maladie de Crohn est le développement du cancer colorectal (CCR). Les patients souffrant de ces pathologies ont un risque accru jusqu'à 30% de développer un CCR (**Figure 7**) [4] [12] [13] [14].

Maladies inflammatoires chroniques



Colite Ulcéreuse Maladie du Crohn

Figure 7 : Maladies inflammatoires chroniques du côlon [15]

I.6. Le cancer colorectal

Le cancer est défini comme un ensemble de maladies dans lesquelles un groupe de cellules anormales se développent de manière incontrôlée en ignorant les règles physiologiques de la division cellulaire et se transformant par conséquent en cellules cancéreuses. Celles-ci développent alors une certaine autonomie par rapport à ces signaux, ce qui entraîne une croissance et une prolifération incontrôlée. Cette prolifération incontrôlée va donner naissance à une tumeur dans un premier temps bénigne peu dangereuse. Lorsque ce type de croissance se produit au niveau du côlon ou du rectum, la maladie est nommée alors un "Cancer Colorectal" (CCR). 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.

Aujourd'hui le CCR est à la croisée des chemins. De nombreux changements sont en cours, mais malheureusement même en tenant compte de tous les progrès thérapeutiques, le CCR demeure au deuxième rang des causes de mortalité par cancer en France. Les avancées thérapeutiques ont permis aux patients porteurs d'un CCR non métastatique une chance de guérison de 75% par rapport à une chance de 50% en cas de métastase tout en assurant la nécessité de préserver la qualité de vie des patients. Les chiffres statistiques de l'incidence et de la mortalité du CCR ainsi que la complexité des choix thérapeutiques nécessiteront plus que jamais une prise en charge pluridisciplinaire et cela poussera la recherche vers le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques d'intelligence apportant un avenir de qualité aux patients [5][16] [17].

I.6.1. Épidémiologie du cancer colorectal

Une estimation de la fréquence du CCR dans le monde, réalisée en 2022 par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et le Centre international de recherche sur le Cancer (CIRC), montre qu'en 2020, pour les deux sexes réunis, ce cancer se situe au troisième rang en termes d'incidence avec environ 1 931 590 nouveaux cas par an ce qui représente 10% du pourcentage des cancers. Il est au deuxième rang en termes de mortalité avec environ 935 173 décès par an représentant 9,4% de la mortalité provoquée par les cancers. Le nombre de nouveaux cas de CCR est estimé à 307 495 chez les hommes et 260 386 chez les femmes en 2020 en France ce qui représente presque 11% des cancers masculins et féminins. Ce cancer se situe en termes de fréquence au 3^{ème} rang chez l'homme derrière le cancer de la prostate et du poumon et au 2^{ème} rang chez la femme derrière le cancer du sein parmi les cancers solides. Comme la plupart des cancers, la courbe transversale des taux d'incidence selon l'âge montre une progression

marquée des taux à partir de l'âge de 50 ans pour les deux sexes et atteint une valeur maximale chez les hommes entre l'âge de 85-89 ans et 90-94 ans chez la femme. Les chiffres montrent que l'âge médian au diagnostic est de 71 ans chez l'homme et 73 ans chez la femme alors que l'âge médian de décès est de 77 ans et 81 ans respectivement. Les statistiques montrent qu'environ 63% des CCR correspondent à des cancers du côlon. Le CCR se caractérise par une potentielle sensibilité à la prévention, au dépistage et au diagnostic précoce ce qui conduit à la diminution du taux de mortalité et a une augmentation de taux de guérison en présence des thérapies convenables (Figures 8 à 11) [18] [19].

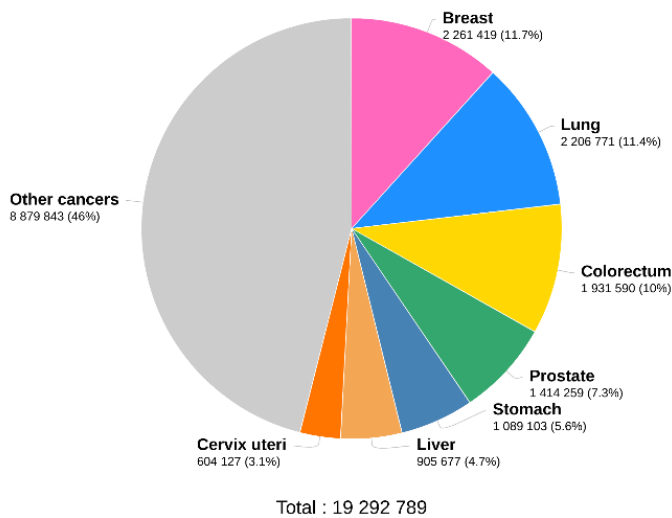


Figure 8 : Estimation du nombre de nouveaux cas en 2020, dans le monde, pour les deux sexes, tous âges confondus.

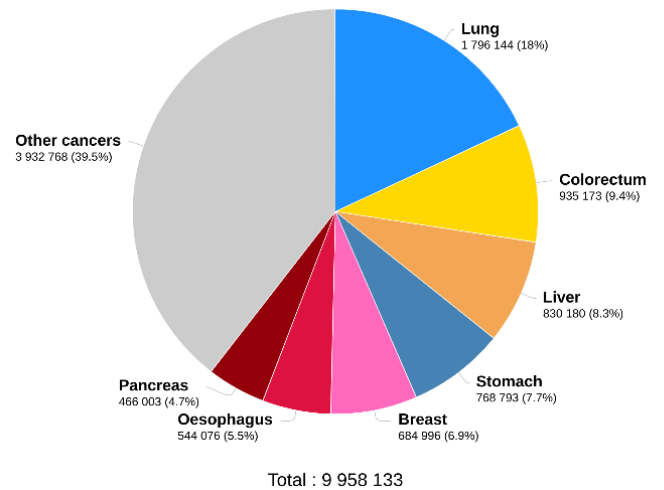


Figure 9 : Estimation du nombre de décès en 2020, dans le monde, pour les deux sexes, tous âges confondus.

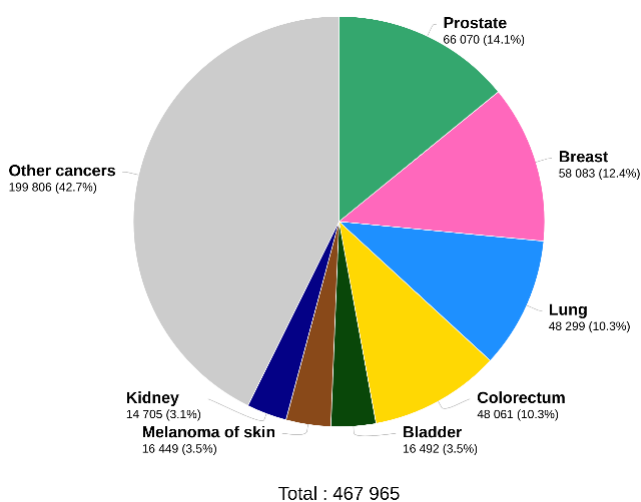


Figure 10 : Estimation du nombre de nouveaux cas en 2020, en France, pour les deux sexes, tous âges confondus. [20]

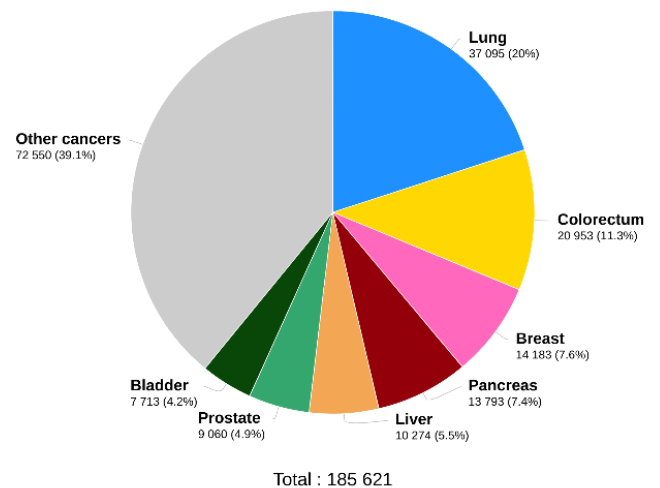


Figure 11 : Estimation du nombre de décès en 2020, en France, pour les deux sexes, tous âges confondus.

I.6.2. Survie et délai de guérison du cancer colorectal

Le taux de survie relative pour le CCR est de 64% à 5 ans après le diagnostic et de 58% à 10 ans. Le facteur prédictif le plus important de la survie au CCR est le stade au moment du diagnostic. Le taux de survie à 5 ans est de 90% pour les 39% de patients diagnostiqués avec une maladie au stade localisé, mais diminue à 71% et 14% pour ceux diagnostiqués avec des stades régionaux et distants, respectivement.

Le cancer rectal est diagnostiqué à un stade localisé un peu plus souvent que le cancer du côlon, 41% contre 38%, probablement en raison de l'apparition précoce des symptômes et expliquant en partie la survie relative globale à 5 ans un peu plus élevée (67% contre 63%). Les facteurs associés à la survie au CCR, en plus du stade, comprennent l'âge au moment du diagnostic, la présence d'autres maladies, d'autres caractéristiques de la tumeur et du patient, telles que la race/l'origine ethnique et le statut socio-économique. Pour des raisons qui ne s'expliquent pas par des différences de tumeurs ou d'autres facteurs connus, les femmes sont légèrement plus susceptibles que les hommes de survivre après un diagnostic de CCR.

Certaines études montrent que les patients atteints de tumeurs situées dans le côlon proximal ont des taux de survie inférieurs à ceux qui ont des tumeurs dans le côlon distal, mais cette association peut être confinée à des diagnostics à un stade éloigné.

Du point de vue "guérison" du CCR, on remarque qu'un délai de guérison peut être estimé à partir de la survie nette correspondant au temps à partir duquel cette survie atteint un plateau. Ce délai est de l'ordre de 10 ans chez les hommes quel que soit l'âge, mais variable selon l'âge chez la femme, et est de 9 ans chez celles âgées de 55-74 ans [18] [21] [22].

I.6.3. Les facteurs de risque du cancer colorectal

Un facteur de risque est tout ce qui augmente la possibilité de développer une maladie. Les facteurs de risque sont divisés en deux types soit modifiable soit non modifiable. Différentes études décrivent qu'un risque de développer un CCR est lié fortement au mode de vie adapté par les patients connus par "Westernized lifestyle". Ce mode de vie se traduit plus précisément par l'obésité, le comportement sédentaire et une alimentation riche en viande, en calories, en gras et pauvre en fibres. Malheureusement, les modes de vie sédentaires sont devenus plus répandus de nos jours. Les personnes physiquement actives présentent un risque réduit de 25% de développer des tumeurs du côlon et du rectum. De même, les récentes recherches montrent que les consommations de tabac et d'alcool jouent un rôle important dans le développement du CCR. En effet, le tabagisme est établi comme une des principales causes évitables de mortalité due à tout type de cancer. Les CCR sont fortement associés au tabagisme lourd et à long terme au vu des composés cancérigènes présents dans le tabac provoquant des anomalies génétiques et épigénétiques. Les études montrent que même une consommation quotidienne d'alcool augmente considérablement le risque de CCR chez les hommes, consommant généralement plus d'alcool que les femmes, et en accord avec une association plus forte entre la consommation

d'alcool et un risque accru d'incidence de CCR. Globalement, près de 48% des cancers pourraient être évités en éliminant les facteurs de risque ayant le plus d'impact.

Par contre, il faut bien noter l'existence de facteurs de risque non modifiables tels qu'en premier lieu l'âge (**Figure 12**). En effet, l'incidence du CCR augmente avec l'âge puisqu'environ 90% des nouveaux cas concernent des personnes de plus de 50 ans, et que les personnes de plus de 65 ans sont trois fois plus susceptibles de développer un CCR. De même, les personnes avec des antécédents d'adénome, de colite inflammatoire étendue, et le fait d'être porteur d'une mutation génétique héréditaire comme dans le syndrome de Lynch et la polypose adénomateuse familiale (PAF), sont à haut risque de développer un CCR [5][22] [23].

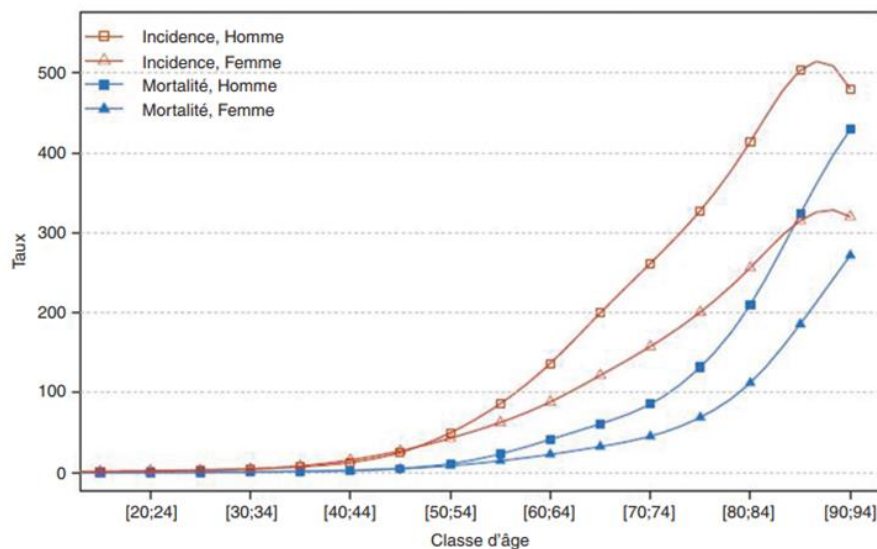


Figure 12 : Taux d'incidence et de mortalité selon la classe d'âge en France en 2018 [24]

I.6.4. Dépistage du cancer colorectal

Le dépistage des cancers vise à détecter au plus tôt et en absence de symptômes les lésions susceptibles d'être cancéreuses ou d'évoluer vers un cancer à l'aide de tests de dépistages. L'intérêt du dépistage est de pouvoir diagnostiquer et traiter une lésion précancéreuse avant qu'elle n'évolue vers un cancer ou diagnostiquer précocement un cancer lorsque le traitement a davantage de chances d'être efficace.

Les modalités recommandées pour le dépistage du CCR diffèrent selon le niveau de risque de la population (**Figure 13**) [25].

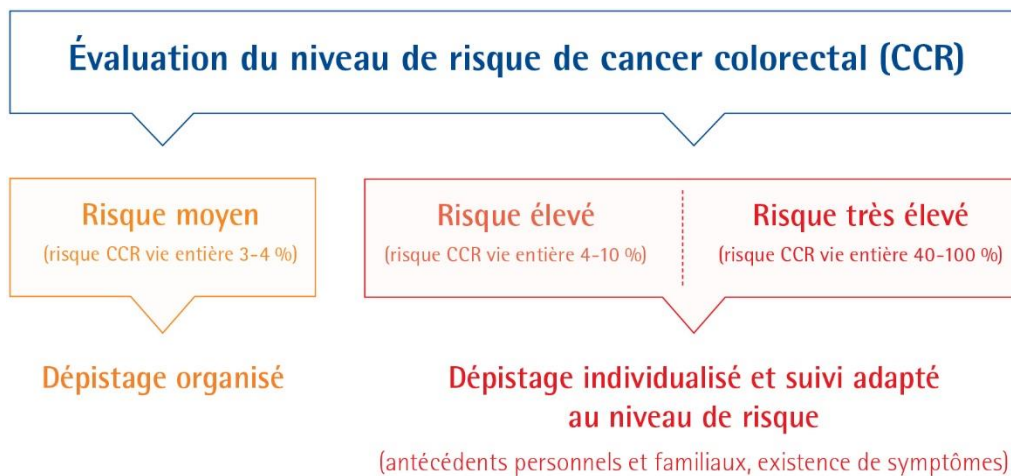


Figure 13 : Dépistage selon le niveau de risque du CCR [26]

I.6.5. Personnes à risque moyen de cancer colorectal

Toute personne âgée de 50 à 74 ans, sans histoire familiale ni antécédent personnel de CCR ou d'adénome et ne présentant pas de symptôme évocateur ni de facteur de risque particulier, est considérée comme une personne "à risque moyen". 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. Le risque est qualifié de "moyen", lorsqu'il est de l'ordre de 4% de développer ce type de cancer. Globalement, 75 à 80% des cancers du côlon surviennent chez ces personnes à risque "moyen".

I.6.6. Personnes à risque élevé de cancer colorectal

On considère que certaines personnes présentent un risque de CCR plus élevé que la moyenne en raison d'antécédents personnels ou familiaux particuliers comme les patients ayant un antécédent personnel de CCR ou d'un (ou plusieurs) adénome(s), même s'il a été retiré en prévention. Ces personnes ont un risque accru de développer un CCR, et ce risque augmente en cas de présence d'antécédents familiaux du premier degré ayant un CCR ou un adénome de plus de 1 cm de diamètre avant 65 ans ou dont deux parents au premier degré ont été atteints par ce type de cancer, quel que soit leur âge au moment du diagnostic. 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 le type de 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. Environ 15 à 20% des CCR surviennent chez des personnes à risque "élevé". Ces personnes présentent 4 à 10 fois plus de risques de développer un CCR que celles à risque "moyen".

I.6.7. Personnes à risque potentiellement très élevé de cancer colorectal

Certaines personnes porteuses d'altérations génétiques constitutionnelles, c'est-à-dire pouvant se transmettre d'une génération à une autre, présentent un risque considéré comme "très élevé" de développer un CCR. C'est particulièrement le cas au sein de familles touchées par des PAF ou par le Syndrome de Lynch où le pourcentage pour ces personnes de développer un CCR est de 100% et 80% respectivement. Les personnes à risque très élevé de développer un CCR représentent 5% de la totalité de ce cancer [25] [26].

I.6.8. La polypose adénomateuse familiale

La PAF est une prédisposition héréditaire, soit à transmission autosomique dominante due à une mutation du gène APC (*Adenomatous polyposis coli*) de pénétrance complète à 100% soit à une mutation bi-allélique du gène MUTYH définie par polypose récessive. Les personnes atteintes de PAF développent graduellement des adénomes, généralement à partir de la puberté et l'atteinte évolue d'une manière à ce que le colon soit recouvert de centaines voire de milliers d'adénomes à l'âge adulte. La transformation maligne est inévitable à l'âge moyen de 45 ans en absence de traitement précoce qui se traduit par une colectomie. 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 tous les 3 à 6 mois [27] [28].

I.6.9. Syndrome de Lynch

Le syndrome de Lynch ou *hereditary non polyposis colon cancer* (HNPCC) est une prédisposition héréditaire au cancer définie par des critères individuels qui ne se fondent pas sur l'existence d'une pathologie précancéreuse. Les cancers sont le plus souvent la conséquence d'une altération constitutionnelle des gènes MMR responsables de la réparation de l'ADN survenant lors de sa réplication. 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. Même s'il ne présente que 3% du nombre total des CCR, le syndrome de Lynch est classifié comme un des facteurs de risque les plus importants à développer un CCR. Les patients atteints de syndrome HNPCC ont un risque de développer d'autres types de cancer, en particulier le cancer de l'endomètre chez la femme, mais également des adénocarcinomes d'autres organes comme l'ovaire, l'estomac et l'intestin grêle. 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 [29] [30].

I.7. Physiopathologie du cancer colorectal

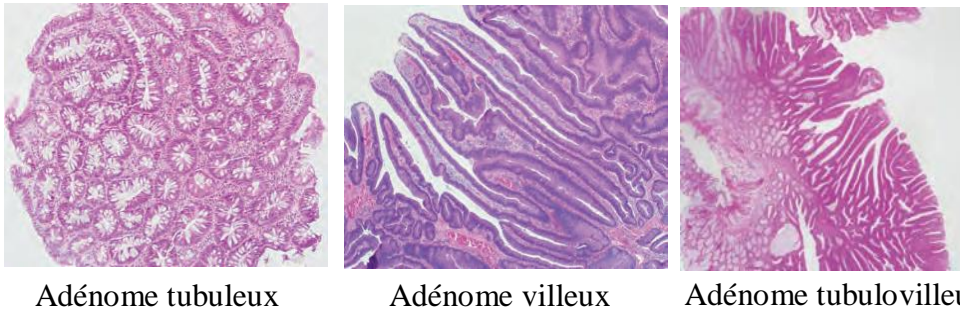
Les CCR se développent le plus souvent à partir d'un polype détecté au cours d'une coloscopie. Bien que bénin dans la majorité des cas, un polype peut en effet dégénérer en cancer. Dans 60 à 80% des cas, les CCR se développent à partir d'un polype adénomateux auparavant bénin. Cependant, tous les polypes n'évoluent pas en cancer du côlon. Ainsi, on considère que sur mille polypes, cent atteindront la taille d'un centimètre à partir de laquelle le risque d'évolution vers un cancer devient plus élevé, et vingt-cinq dégénèrent en CCR dans un délai d'une dizaine d'années. En fait, les polypes du côlon sont des lésions massives ou d'une autre manière des transformations protubérantes faisant saillie de la muqueuse intestinale vers la lumière intestinale. Ces polypes se produisent à la suite de tout défaut dans les étapes de prolifération, de différenciation ou d'apoptose cellulaire dans la muqueuse normale. Généralement, les polypes sont bénins ; cependant, leur diagnostic, leur traitement et leur suivi sont importants puisque certains polypes peuvent avoir des potentiels à évoluer vers un cancer. Les symptômes et les découvertes de polypes dépendent de leur taille et de leur emplacement. Les petits polypes du côlon sont généralement asymptomatiques et diagnostiqués fortuitement lors d'examen endoscopiques et radiographiques effectués à d'autres fins. Les polypes peuvent s'ulcérer et saigner, causer des douleurs en affectant les ondes péristaltiques, et les gros polypes peuvent provoquer une occlusion intestinale. Les polypes colorectaux sont classés par leur aspect macroscopique comme pédiculés (s'étendant de la muqueuse à travers une tige fibrovasculaire) ou sessiles (plats, provenant directement de la muqueuse). Les polypes colorectaux sont également histologiquement classés comme néoplasiques (adénomes ou DALM référant à *dysplasia associated lesion or mass*) ou non néoplasiques (hyperplasiques, hamartomateux ou inflammatoires). Seuls les polypes adénomateux peuvent se transformer en cancers.

I.7.1. Les polypes adénomateux

Les polypes adénomateux sont les plus fréquents et les plus importants des polypes, ils constituent une excroissance d'épithélium glandulaire dysplasique à risque donc de transformation maligne qui augmente avec la taille des polypes. Leurs architectures glandulaires exagérées se présentent sous divers sous-types :

- a- L'adénome tubuleux : c'est le plus courant des adénomes, environ 75% des adénomes avec une prolifération de glandes identiques aux glandes de Lieberkhün dont elles naissent. 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.

- b- L'adénome vilieux : le plus rare, il est retrouvé seulement dans 5% des cas. C'est un adénome qui présente un aspect velu, assez gros et difficile à enlever puisque son architecture se présente sous forme de villosités ou de projections d'adénome en forme de feuille ou en forme de doigt qui s'étendent de la base du polype jusqu'à la lumière intestinale. Du fait qu'il ait plus de risque d'évoluer en CCR et de par la complexité à l'enlever, il est souvent nécessaire de pratiquer une colectomie.
- c- L'adénome tubulovilleux : c'est un adénome qui associe les deux types précédents, il est retrouvé dans environ 20% des cas. Les cellules suivent les deux modèles de croissance tubuleux et vilieux. Cet adénome regroupe des potentiels similaires de développer un CCR jusqu'à un risque de 14% en comparaison avec l'adénome tubuleux (1%) et l'adénome vilieux (14%) (**Figure 14**) [28][31] [32].
- d- L'adénome plan ou dysplasie : contrairement aux autres adénomes, l'adénome plan ne se développe pas en relief sous forme d'excroissance mais à plat. Il s'agit d'une lésion de moins de 1 cm de diamètre et d'environ 1,5 mm de hauteur. Il représente le risque le plus important des adénomes à évoluer en CCR. Le cancer invasif est précédé par une dysplasie. On décrit deux degrés de dysplasie : soit à bas grade, soit à haut grade. Tout adénome bénin est par définition en dysplasie de bas grade. La dysplasie de haut grade correspond au premier stade du cancer (cancer intra-épithélial)



Adénome tubuleux

Adénome vilieux

Adénome tubulovilleux

Figure 14 : Polypes adénomateux [33]

I.7.2. Les polypes non néoplasiques

Les polypes non néoplasiques regroupent les polypes non considérés comme précurseur de cancer qui tapissent le revêtement du côlon. Le traitement habituel consiste à les retirer par chirurgie.

- a- Les polypes hyperplasiques se présentent comme un simple allongement des cryptes glandulaires dont le contour luminal prend un aspect festonné. Ils prédominent dans le côlon distal et le rectum. La prévalence des polypes hyperplasiques sporadiques augmente avec l'âge ; elle est de l'ordre de 20 à 30% à 50 ans.

- b- Les polypes hamartomateux sont formés de tubes kystiques développés dans un chorion souvent inflammatoire. Les polypes juvéniles sporadiques sont rares, le plus souvent uniques et observés chez les enfants âgés de 1 à 7 ans.
- c- Les pseudo-polypes inflammatoires sont formés de muqueuse et de tissu de granulation. Ils représentent un îlot résiduel isolé après cicatrisation d'ulcérations de rectocolite hémorragique et de maladie de Crohn (**Figure 15**).

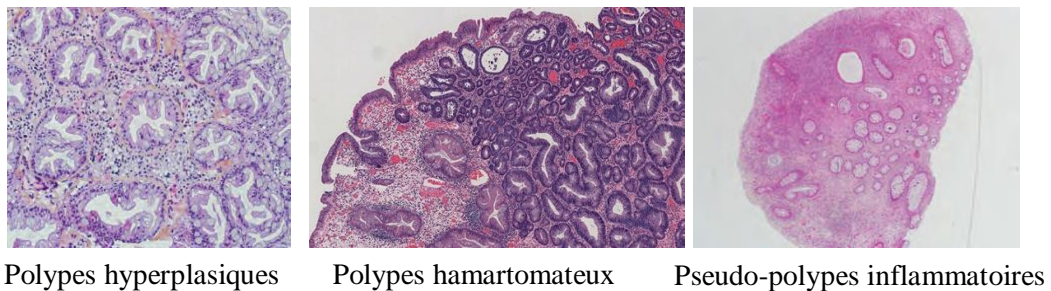


Figure 15 : Polypes non néoplasiques [3] [4]

I.8. Diagnostic et classification du cancer colorectal

Les CCR sont une des principales causes de décès dans le monde, heureusement, le taux de mortalité est en réduction durant les dernières décennies. L'une des causes de cette réduction est due au dépistage et au diagnostic précoce lorsque les polypes sont détectés et éliminés à un stade précoce avant qu'ils ne se soient propagés.

Le bilan du diagnostic du CCR se traduit par plusieurs étapes principales :

I.8.1. Le diagnostic clinique

L'examen clinique par un toucher rectal et l'interrogatoire à la recherche d'antécédents familiaux de cancer, ainsi que le dosage du marqueur tumoral antigène carcino-embryonnaire (ACE) doivent être réalisés devant la suspicion d'un CCR. Cependant, l'ACE manque de sensibilité et ne peut pas servir pour le diagnostic du CCR, il est pourtant un marqueur pronostic et de suivi.

Le toucher rectal est un examen qui permet au médecin l'estimation et la détection subjective mais reproductible avec le doigt de la présence d'une masse ou d'une enflure ou de mesurer la distance entre la tumeur rectale et l'anus par rapport au bord supérieur du sphincter externe. Lorsqu'elle est accessible cliniquement, il est possible d'estimer si la tumeur est circonscrite ou non, si elle est franchissable, sa taille et sa mobilité par rapport au plancher pelvien (**Figure 16**) [28] [34] .

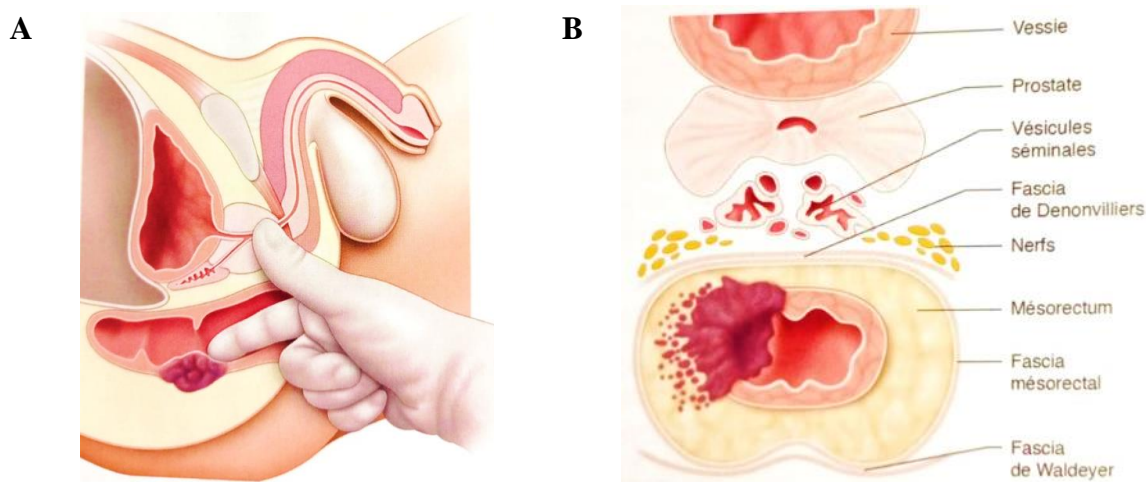


Figure 16 : Diagnostic clinique par toucher rectal (A), Dissémination de la tumeur dans le Mésorectum (B). [28]

I.8.2. Diagnostic par coloscopie

La coloscopie est le *gold standard* pour le dépistage et le diagnostic du CCR. C'est à la fois un outil de diagnostic et thérapeutique vue la possibilité de réaliser des biopsies afin d'évaluer l'histologie de la malignité de la lésion. Elle permet l'excision de la lésion dysplasique et/ou précancéreuse. La sensibilité de la coloscopie à détecter les CCR est de 88% à 98% dans le cas d'un adénome de 10 mm de diamètre. Les études ont montré une réduction de 53% à 72% de l'incidence du CCR et une réduction de 31% de la mortalité liée au CCR grâce au diagnostic précoce par coloscopie. Cette technique peut également évaluer à la fois la partie proximale et la partie distale du côlon. Les limites associées à la coloscopie comprennent le caractère invasif de la procédure, la préparation intestinale, le recours à la sédation ou à l'anesthésie. La préparation intestinale est souvent désagréable et prend du temps, vue la nécessité d'un régime alimentaire précis pendant 48h, et implique l'utilisation d'un agent nettoyant du côlon.

Il faut noter qu'en cas d'échec d'une coloscopie normale, une coloscopie virtuelle ou Colo-TDM est mise en place, c'est un outil de diagnostic non invasif et performant, tout aussi sensible que la coloscopie classique, avec les mêmes performances pour diagnostiquer des lésions d'une taille supérieure à 9 mm. L'analyse par Colo-TDM montre une sensibilité de 96% pour la détection du CCR.

C'est une alternative à la coloscopie où on estime que 10% des analyses sont incomplètes. Cet examen est particulièrement utile pour la détection de tumeurs synchrones dans les CCR sténosants non franchis à l'endoscopie, avec une sensibilité de 100% [35] [36].

I.8.3. Diagnostic par des analyses biochimiques et anatomopathologiques

Une fois confirmée la présence d'un polype, un certain nombre d'examens doivent être mis en place pour confirmer le diagnostic du cancer du côlon et évaluer son stade quel que soit le contexte dans lequel le cancer est découvert. L'ensemble de ces examens est appelé le "Bilan diagnostique". Ce bilan se traduit premièrement par des analyses biologiques et biochimiques sanguines en particulier le dosage de l'ACE. L'ACE est une protéine normalement présente dans l'organisme mais elle peut être produite en excès par certaines cellules cancéreuses. Ainsi, un taux normal d'ACE dans le sang n'exclut pas un cancer mais un taux anormalement élevé peut-être corrélé à la présence d'une tumeur cancéreuse. En pratique, le dosage de l'ACE permet l'évaluation initiale des cancers métastatiques. D'autres examens sanguins classiques sont également effectués, comme une numération de formule sanguine et la mesure du taux de créatinine afin de vérifier le fonctionnement des reins.

En second lieu, une analyse anatomopathologique est réalisée sur une biopsie prélevée au cours de la coloscopie afin de confirmer le diagnostic du cancer et en parallèle connaître les caractéristiques de la tumeur. Cet examen consiste à analyser du tissu ou des cellules de la tumeur dans le but de déterminer sa classification et sa rapidité d'évolution. De plus, on recherche aujourd'hui certaines particularités génétiques favorisant les tumeurs colorectales, comme une mutation des gènes RAS ou BRAF ou encore une instabilité microsatellitaire (MSI). Les résultats permettront selon les cas de dépister une forme génétique de CCR, d'évaluer le pronostic de la maladie ou encore d'orienter le traitement vers des thérapies ciblées [28][37].

I.9. Classification TNM

Après la confirmation de la présence de la tumeur, il est très important d'identifier le stade du cancer afin d'orienter le protocole de traitement. La classification TNM est un système international de classement des cancers selon leur extension anatomique permettant l'évaluation des stades grâce à une combinaison de 3 critères de propagation anatomique locale, régionale et métastatique. Les trois lettres symbolisent la propagation de la maladie cancéreuse sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques voisins (N pour *Node*) et à distance pour d'éventuelles métastases (M). Chaque lettre est affectée d'un coefficient. Dans son principe, cette classification considère seulement les données cliniques et ne s'applique qu'à des cancers qui n'ont pas encore été traités [38] [39] [40].

La lettre T est l'indicateur de la taille et de la profondeur de la tumeur

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. La lettre " T " symbolise la tumeur initiale. Elle est codée de T0 (quand la lésion primitive n'est pas localisée) à T4 pour les tumeurs les plus étendues (**Figure 17**) (**Tableau 1**).

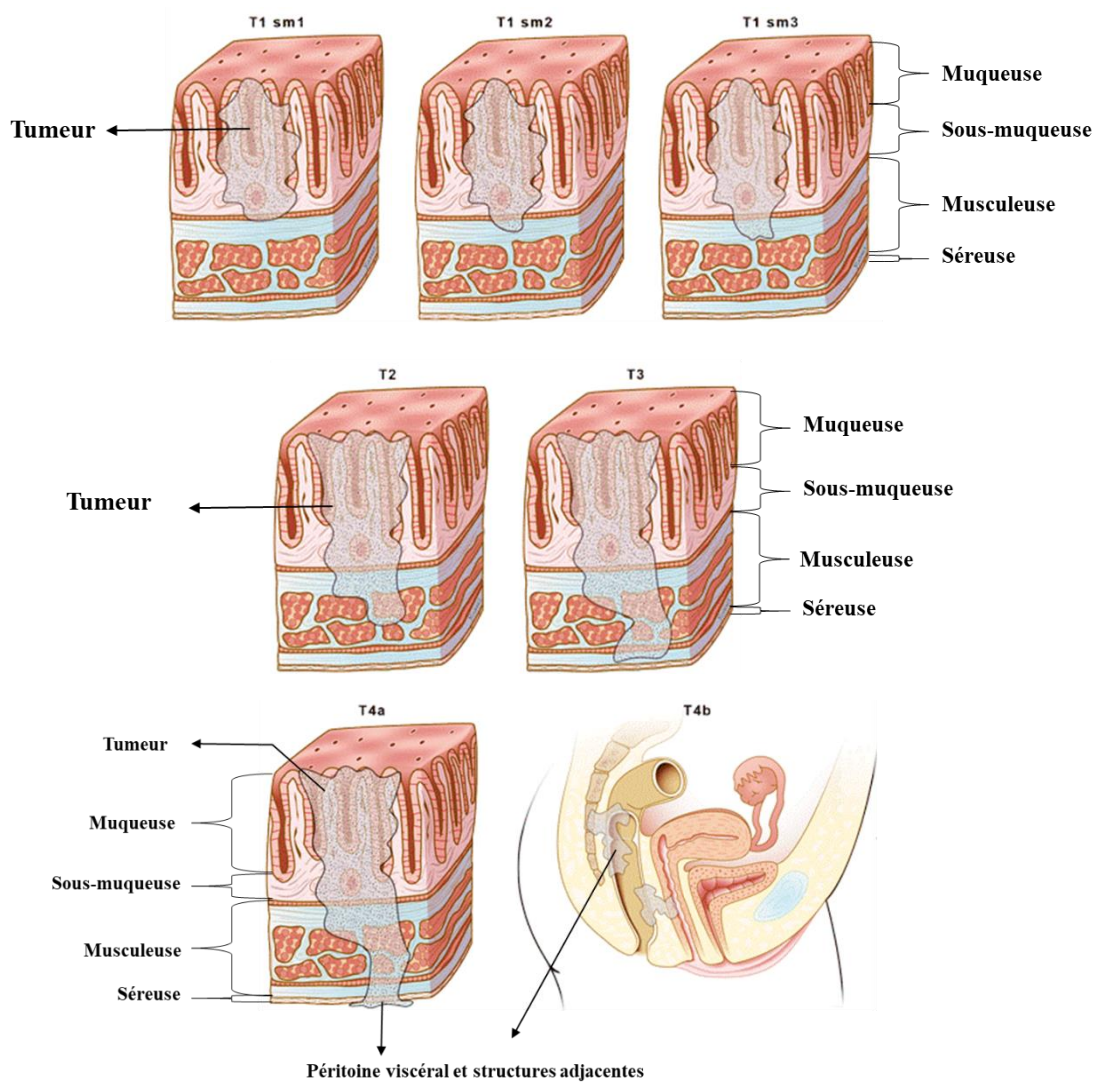


Figure 17 : Classification TNM - la lettre " T" [41]

Tableau 1 : Les indicateurs de la lettre "T"

La lettre " T " symbolisant la tumeur initiale
Tx : Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
T0 : Pas de signe de tumeur primitive
Tis : Carcinome in situ : intra-épithélial ou intra muqueux envahissant la lamina propria (chorion de la muqueuse)
T1 : Tumeur envahissant la sous-muqueuse -T1 sm1, sm2, sm3 : les chiffres de 1-3 réfèrent la profondeur de pénétration dans la sous-muqueuse.
T2 : Tumeur envahissant la musculuse
T3 : Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péri-coliques ou périrectaux non péritonisés
T4 : Tumeur envahissant le péritoine viscéral et/ou au moins une structure et/ou organe de voisinage -T4a : pénétration du péritoine viscéral -T4b : envahissement d'une structure de voisinage

La lettre N est l'indicateur de l'atteinte ganglionnaire et du nombre de ganglions lymphatiques touchés

La lettre "N" signifie ganglions lymphatiques, et indique la capacité des cellules cancéreuses à se propager aux ganglions lymphatiques environnants entourant l'organe. N0 signifie que le cancer ne s'est propagé à aucun ganglion lymphatique voisin. N1, N2 ou N3 signifie que le cancer a atteint les ganglions lymphatiques. N1 à N3 peuvent aussi révéler le nombre de ganglions lymphatiques qui sont atteints par le cancer ainsi que leur taille et leur emplacement. En effet, 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 (**Figure 18**) (**Tableau 2**).

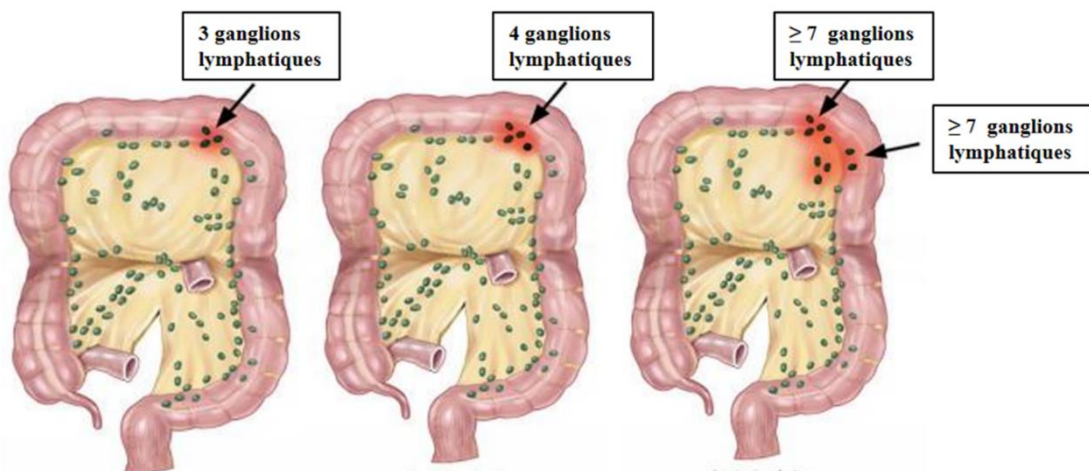


Figure 18 : Classification TNM - la lettre " N" [42]

Tableau 2 : Les indicateurs de la lettre "N"

La lettre "N" symbolisant l'atteinte des ganglions lymphatiques
N_x : Renseignements insuffisants pour classer les ganglions lymphatiques régionaux
N₀ : Pas de métastase ganglionnaire régionale
N₁ : Métastase dans 1 à 3 ganglions régionaux -N _{1a} : métastase dans 1 ganglion lymphatique régional -N _{1b} : métastases dans 2-3 ganglions lymphatiques régionaux -N _{1c} : dépôts tumoraux "satellites" dans la sous-séreuse, ou dans le tissu péricolique ou périrectal non péritonisé, en absence de ganglion métastatique
N₂ : Métastases de ≥ 4 ganglions lymphatiques régionaux -N _{2a} : Métastases de 4-6 ganglions lymphatiques régionaux -N _{2b} : Métastases de ≥ 7 ganglions lymphatiques régionaux

La lettre M est l'indicateur de présence de métastases à distance

La lettre "M" signifie métastase. Cet indicateur décrit la propagation du cancer à d'autres parties du corps par le sang ou le système lymphatique.

Le phénomène métastatique constitue la seconde étape de dissémination après les ganglions lymphatiques. En effet, plus le cancer se situe à un stade avancé, plus les risques de métastases

sont importants. Ce stade est symbolisé par la lettre "M" référant aux métastases où les cellules cancéreuses ont le potentiel d'envahir d'autres organes que le gros intestin et y développer un cancer secondaire. La lettre " M " est cotée M0 en l'absence de métastases connues ou M1 en leur présence, quel que soit leur siège, unique ou multiple. 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 (Figure 19) (Tableau 3).

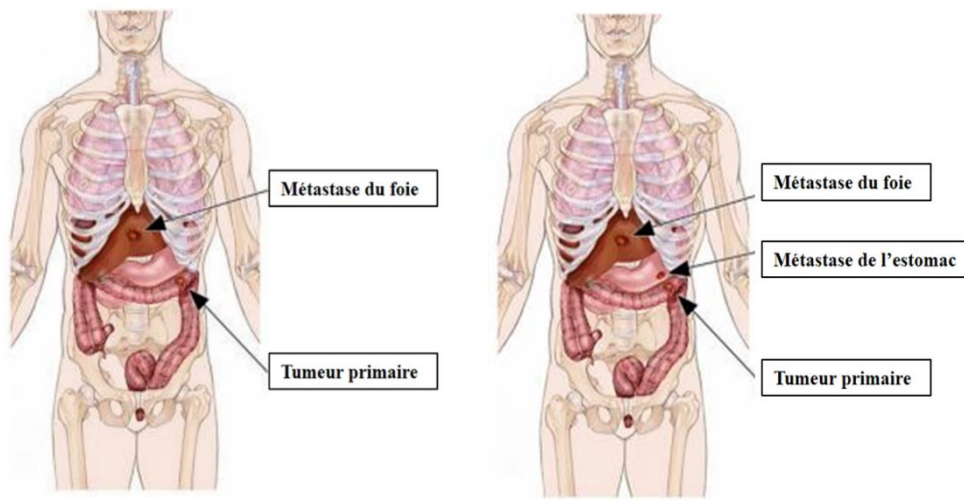


Figure 19 : Classification TNM - la lettre " M " [42]

Tableau 3 : Les indicateurs de la lettre "M"

La lettre " M " symbolisant les métastases à distance
M0 : Pas de métastase à distance
M1 : Métastase à distance
-M1a : métastase à distance confinée à un organe sans atteinte péritonéale : foie, poumon, ovaire, ganglions non régionaux
-M1b : métastases atteignant plus d'un site métastatique
-M1c : métastases péritonéales avec ou sans autre organe atteint

Les stades selon la classification TNM

Le système de stadification le plus fréquemment employé pour le CCR est la classification TNM. Le groupement des critères TNM permet de définir les stades du CCR au moment du diagnostic progressant du stade 0 au stade IV permettant alors la définition de la meilleure stratégie thérapeutique à adapter afin d'obtenir les meilleures chances de guérison du patient. En général, plus les chiffres sont élevés, plus le cancer est propagé par conséquent le patient a un pourcentage de guérison plus faible.

- **Stade 0** (carcinome *in situ*)

Le cancer est à son stade le plus précoce. Cette étape est également connue sous le nom de carcinome *in situ* ou carcinome intramuqueux. Les cellules cancéreuses se trouvent seulement dans le revêtement interne (muqueuse) du côlon ou du rectum. On pourrait les observer dans l'épithélium, où elles pourraient avoir envahi la couche de tissu conjonctif de la muqueuse. Les cellules cancéreuses ne se sont pas développées au-delà de la couche musculaire de la muqueuse.

- **Stade I**

La tumeur a envahi la sous-muqueuse, et elle peut également s'être développée dans la musculature du côlon ou du rectum mais ne s'est pas propagée aux ganglions lymphatiques voisins ou à des sites distants.

- **Stade II**

Le stade II regroupe plusieurs sous-classements IIA, IIB et IIC.

Dans le cas du stade IIA, la tumeur a envahi la couche de tissu située entre la musculature et la séreuse ou bien elle a envahi des tissus au-delà de la musculature, là où il n'y a pas de séreuse.

Dans le cas du stade IIB, la tumeur a traversé la membrane qui recouvre et soutient le côlon et le rectum (séreuse ou péritoine viscéral).

Dans le cas du stade IIC, la tumeur a traversé la paroi du côlon ou du rectum jusqu'à d'autres organes ou régions du corps, comme la vessie, la prostate ou l'utérus.

- **Stade III**

A ce stade les cellules cancéreuses ont envahi les ganglions lymphatiques situés près du côlon ou du rectum. Le stade III peut être également divisé en stades IIIA, IIIB et IIIC selon l'étendue de la tumeur et le nombre de ganglions lymphatiques atteints par la tumeur.

- **Stade IV**

La tumeur s'est propagée à d'autres parties du corps (métastases à distance), comme au foie ou aux poumons. On parle aussi d'un CCR métastatique. A ce stade la tumeur peut avoir atteint un seul organe ou des ganglions lymphatiques éloignés, on parle alors du stade IVA. Si la tumeur a atteint plus d'un organe, c'est alors le stade IVB. Dans le cas où la tumeur envahit le péritoine, il s'agit du stade le plus agressif du CCR défini par le stade IVC (**Tableau 4**) (**Figure 20**) [43].

Tableau 4 : Classification du cancer colorectal selon les stades

Les différents stades du cancer	
Stade 0	Tis-N-M0
Stade I	T1, T2-N0-M0
Stade II	T3, T4 -N0-M0
Stade II A	T3 -N0 -M0
Stade II B	T4a -N0 -M0
Stade II C	T4b-N0-M0
Stade III	Tous T-N1, N2-M0
Stade III A	T1, T2-N1-M0
	T1-N2a-M0
Stade III B	T3, T4a-N1-M0
	T2, T3-N2a-M0
	T1, T2-N2b-M0
Stade III C	T4a-N2a-M0
	T3, T4a-N2b-M0
	T4b-N1, N2-M0
Stade IV	Tous T -tous N-M1a
Stade IV	Tous T -tous N-M1b
Stade IV	Tous T -tous N-M1c

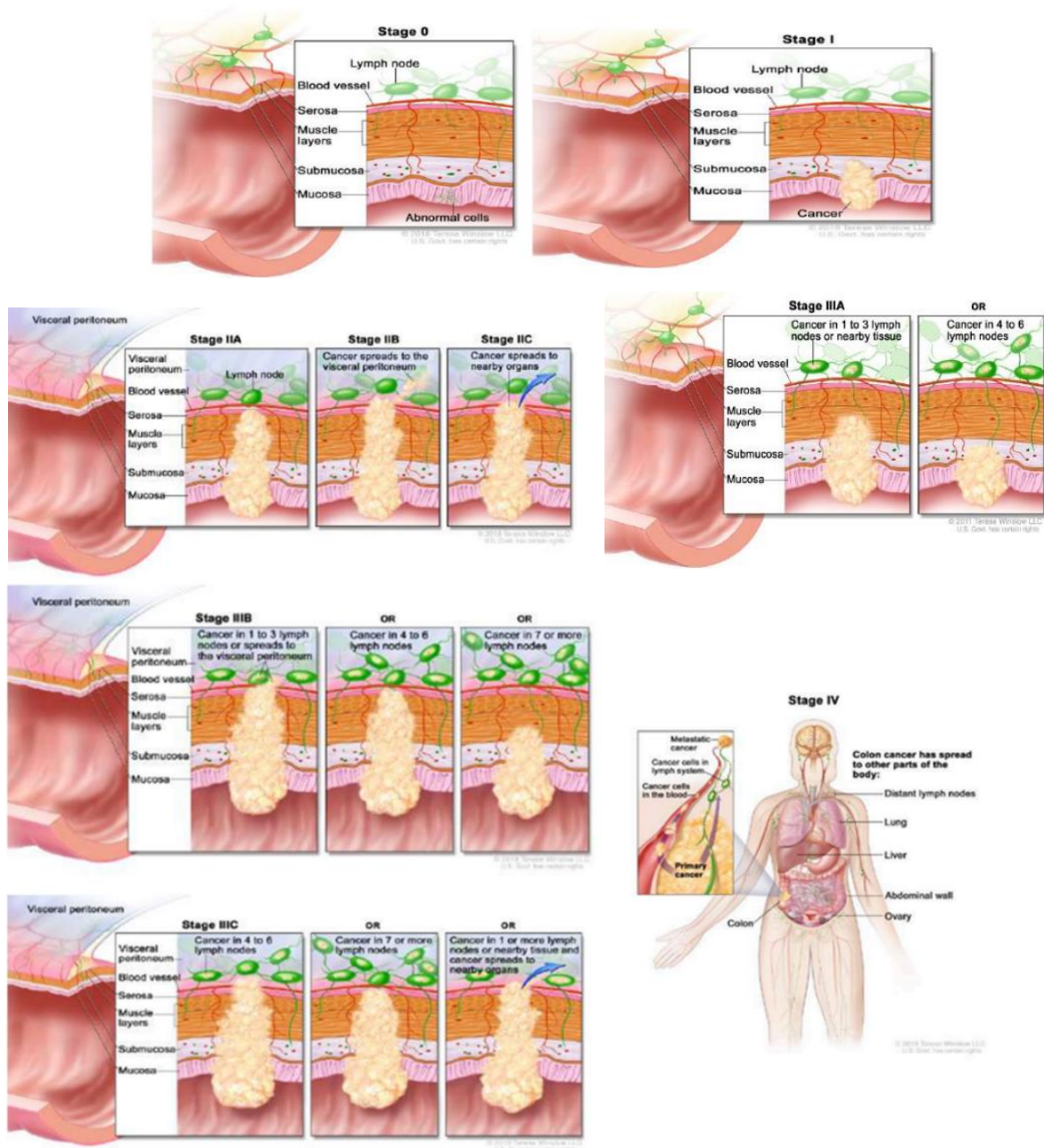


Figure 20 : Classification TNM-selon les différents stades [44]

I.10. Traitements

Les stratégies utilisées pour traiter le CCR impliquent de nombreuses méthodes scientifiques conventionnelles et avancées. Les choix thérapeutiques sont validés par des groupes multidisciplinaires associant des gastro-entérologues, chirurgiens, oncologues, radiothérapeutes, radiologues, pathologistes, médecins généralistes et bien évidemment un psychologue. Le protocole de traitement dépend du stade de la tumeur, de l'âge du patient, du système immunitaire du patient et du mode de vie du patient. Les méthodes conventionnelles de traitement du cancer du côlon impliquent la chirurgie/polypectomie, la radiothérapie, la chimiothérapie, les thérapies combinées et les thérapies ciblées. Ces méthodes ne suffisent pas pour le traitement complet du CCR, c'est pourquoi les chercheurs ont essayé de fournir des approches alternatives avancées pour faire face aux inconvénients des méthodes conventionnelles et pour essayer de combattre la résistance du CCR aux traitements classiques. Les méthodes avancées impliquent l'immunothérapie, les thérapies géniques, la nanomédecine et les thérapies laser [45].

I.10.1. Méthodes conventionnelles

I.10.1.1. Chirurgie/Polypectomie

Si le CCR est diagnostiqué à des stades très précoces (I et II), la chirurgie est un traitement efficace pour l'ablation du polype ou de la tumeur. Cependant, certaines chirurgies compliquées sont également effectuées pour l'ablation d'un polype localisé spécifique au stade tardif. Le cancer à un stade très précoce contenu uniquement dans un polype peut être retiré lors de la coloscopie ; cette ablation du polype précoce est connue sous le nom de polypectomie. Les polypes plus gros peuvent être enlevés par le petit retrait de la paroi interne du côlon (**Figure 21 A et B**).

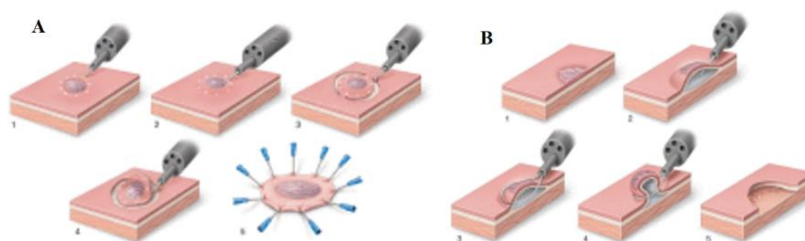


Figure 21 : Polypectomie (A) : un stade précoce du cancer ; (B) : polype plus développé [45]

Pour les polypes les plus avancés qui ne peuvent pas être enlevés par coloscopie, de nos jours, la chirurgie par laparoscopie est utilisée pour enlever le polype de la paroi abdominale. Si une grande partie du polype du CCR couvre la petite partie du côlon, elle peut être retirée par colectomie partielle dans laquelle la région cancéreuse et certaines parties du tissu sain sont retirées. La

localisation de la tumeur et son stade influent sur l'importance de la zone à retirer. On parle d'hémi-colectomie droite ou gauche lorsque la moitié droite ou gauche ainsi que la moitié adjacente du côlon transverse sont retirées (**Figure 22**). Après une colectomie partielle, la partie restante est reconnectée au côlon ou au rectum, mais si ce n'est pas possible, une colostomie doit être effectuée pour l'élimination des déchets du corps. La colostomie fournit une stomie dans le gros intestin pour l'élimination des selles (la racine alternative du rectum) (**Figure 23**). Cela peut être temporaire pour cicatriser l'acte chirurgical ou peut être permanent. Malgré tous ces traitements chirurgicaux, il existe un risque de réapparition de la tumeur, ce qui en fait à nouveau un traitement incomplet [45] [46].

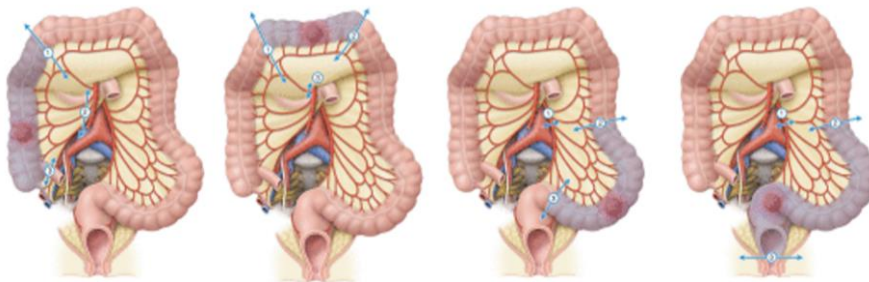


Figure 22 : Hémi-colectomie droite, gauche ou transverse du côlon [45]

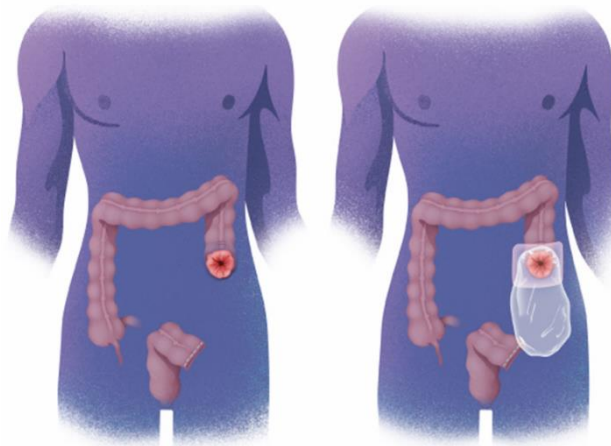


Figure 23 : La colostomie du côlon [47]

I.10.1.2. 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. La radiothérapie est utile pour réduire la taille de la tumeur avant la chirurgie compliquée de soustraction tumorale. Les rayonnements de haute énergie (rayons X, ondes radio et protons) sont soumis aux tumeurs localisées via différentes racines du corps. Les types de cette thérapie comprennent la radiothérapie externe EBRT (*External beam radiation therapy*), la radiothérapie interne sélective SIRT (*Selective interne radiotherapy*) /curiethérapie, la radiothérapie endocavitaire, et curiethérapie interstitielle. L'EBRT est fournie par un dispositif extérieur au corps avec des radiations très intenses. La SIRT est principalement utilisée dans le cas du CCR dans lequel une source radioactive est insérée dans le rectum à proximité ou à l'intérieur de la tumeur. Ces radiations ne sont pas autorisées à traverser la peau et d'autres tissus sains pour réduire les effets secondaires des autres organes. Les radiothérapies endocavitaires utilisent un dispositif avec un petit ballon inséré dans le rectum par l'anus et délivrent des radiations de haute intensité. Le but principal de cette thérapie est d'éviter une chirurgie compliquée et une colostomie. La curiethérapie intestinale a été soumise à un tube inséré dans le rectum. Le tube est rempli de petits morceaux de matière radioactive et les radiations sont autorisées sur une courte distance pendant une courte période pour limiter les effets nocifs des radiations. Cette méthode est utilisée lorsque le patient n'est pas apte à la chirurgie. La radiothérapie est opérationnelle en tant que thérapie adjuvante ou supplémentaire soit avant ou après la chirurgie. Les risques de récurrence sont réduits en radiothérapie, mais le nombre d'effets secondaires est toujours élevé, comme l'irritation cutanée, les nausées, l'irritation rectale, les fuites de selles, les problèmes sexuels et la fibrose [48].

I.10.1.3. Chimiothérapie

La chimiothérapie est la principale stratégie de traitement pour tout cancer, qui consiste à administrer au patient divers types de molécules chimiques 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 bénéfico-risque est trop faible. 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 récurrences. L'administration peut être orale mais le plus souvent elle est sous forme intraveineuse et de manière répétée.

Les molécules chimiques utilisées peuvent être un alcaloïde végétal, des antimétabolites, des enzymes, des agents alkylants, des antibiotiques antitumoraux et des hormones. La plupart du

temps, la chimiothérapie est effectuée après la chirurgie si le CCR s'est propagé jusqu'aux ganglions lymphatiques, mais elle peut également être utilisée avant la chirurgie pour faciliter l'ablation de la tumeur. L'objectif principal de la chimiothérapie est de détruire les cellules cancéreuses en ciblant l'inhibition de la réplication de l'ADN, d'interférer avec la séparation chromosomique au cours du cycle cellulaire ou de fournir directement un environnement cytotoxique à la tumeur. Mais le principal inconvénient de la chimiothérapie est qu'elle cible toutes les cellules qui se divisent rapidement dans le corps, alors les cellules saines sont également détruites par ce traitement. Avec l'implication de toutes les cellules à division rapide, seule une petite quantité du médicament peut les atteindre et réduire à nouveau les résultats attendus du médicament. Jusqu'à présent, aucun médicament ne peut cibler uniquement les cellules cancéreuses sans affecter les cellules saines. Concernant le cancer du côlon, le 5-fluorouracile (5-FU, inhibiteur de la thymidine synthase) est resté l'agent chimiothérapeutiques de première intention à visée thérapeutique. Généralement, il est utilisé avec des combinaisons de différents médicaments, par exemple la leucovorine (une vitamine), la capécitabine (Xeloda), l'oxaliplatine (Eloxatin), l'irinotécan (Camptosar), le ramucirumab (Cyramza), le cetuximab (Erbix) qui agissent comme adjuvants pour améliorer l'efficacité du médicament. Le régorafénib (Stivarga) est un nouveau médicament qui peut être utilisé sans 5-FU pour traiter le CCR. Le régorafénib ciblant l'axe SHP-1-STAT3 ; SHP-1 (SH2 contenant le domaine phosphatase-1), est un suppresseur du CRC et inhibe la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) [49].

I.10.1.4. Thérapies combinées

Les différents types de stratégies de traitement ont des effets secondaires différents, donc pour récupérer ces effets secondaires, la thérapie combinée est une option efficace principalement dans les traitements du cancer. La chimiothérapie elle-même est une thérapie combinée dans laquelle deux ou trois médicaments sont utilisés en combinaison. La chimiothérapie est la thérapie centrale et est associée le plus souvent à tous les types de thérapie pour obtenir une réponse efficace. Par exemple, la chimiothérapie et la radiothérapie peuvent être associées à la chirurgie pour réduire la taille de la tumeur [50].

I.10.1.5. Thérapies ciblées

Les thérapies ciblées sont dirigées vers un type spécifique de cellules et n'exercent pas leurs effets sur d'autres cellules. Dans le cas du cancer, les thérapies ciblées peuvent agir à plusieurs niveaux, comme l'inhibition de la prolifération, de la migration et de la différenciation. Les principaux agents responsables du ciblage sont des anticorps monoclonaux. Ceux-ci ciblent des composants extracellulaires ou intracellulaires et induisent la mort cellulaire par de nombreux mécanismes [51].

Ciblage du EGFR

L'EGFR (récepteur du facteur de croissance épidermique) fait partie des récepteurs ErbB (erythroblastosis oncogène B) et HER (facteur de croissance épidermique humain). Il existe 8 isoformes au total. Ils appartiennent à la classe des récepteurs à tyrosine kinase. La molécule d'activation est l'EGF/TGF- α . Lors de l'activation, de nombreuses voies de signalisation telles que JAK/STAT3, RAS, RAF, MEK sont activées, ce qui conduit à une prolifération cellulaire. Celles-ci sont surexprimées dans les cancers comme le gliome, le mélanome, le cancer de l'œsophage et le plus important le CCR [52].

Ciblage du VEGF

L'angiogenèse est un événement important dans les tumeurs malignes qui comprend la formation ou la néoformation de vaisseaux sanguins à partir d'un réseau local d'origine. Ce processus est régulé par de nombreux facteurs favorisant ou s'opposant à l'angiogenèse, tels que le facteur de croissance endothélial vasculaire VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), les facteurs de croissance des fibroblastes (TGF- α et TGF- β). Le VEGF interagit avec d'autres protéines telles que les intégrines pour contrôler l'angiogenèse. La famille des VEGF contient 5 isoformes : les types A, B, C, D et le facteur de croissance placentaire. Ceux-ci se fixent à la membrane cellulaire par l'intermédiaire d'un récepteur à tyrosine kinase. Les récepteurs du VEGF sont de 3 types - VEGFR-1, 2, 3. Les anti-angiogéniques ont pour rôle de bloquer l'interaction du 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 24**) [53]

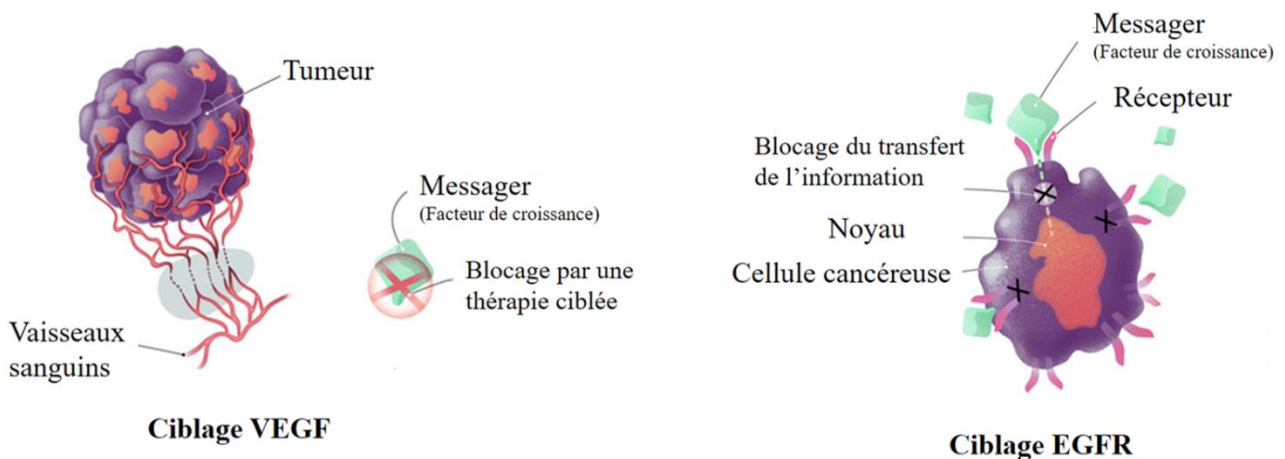


Figure 24 : Principe de la thérapie ciblée dans le traitement du cancer colorectal [54]

I.10.2. Les approches avancées pour traiter le cancer du côlon

I.10.2.1. Immunothérapie

Notre système immunitaire est une aubaine, pour nous protéger contre différentes maladies, mais s'il échoue ou sa surprotection peut être une malédiction. Les personnes dont le système immunitaire est sain, peuvent également être susceptibles de développer un cancer lorsqu'il ne parvient pas à faire la distinction entre les cellules normales et cancéreuses et donc à reconnaître une cellule cancéreuse comme une cellule normale. Parfois, les systèmes immunitaires reconnaissent les cellules cancéreuses comme des antigènes étrangers mais sont incapables de produire une réponse efficace pour les tuer, car ces cellules peuvent sécréter certains composants immunosuppresseurs. Les scientifiques ont essayé de développer une médecine immunorégulatrice de façon à ce qu'un ligand, un anticorps et des cellules immunitaires modifiées puissent réguler positivement le système immunitaire, détruire les cellules cancéreuses, mais aussi réduire les effets secondaires des autres traitements. L'avancement de l'immunothérapie revient à améliorer les performances du système immunitaire naturel du corps du patient pour le traitement du cancer. Le fonctionnement et la régulation des complexes du système immunitaire fournissent ainsi des pistes stratégiques différentes dans le traitement du cancer. Généralement, la nature de l'immunothérapie est autologue, ce qui signifie que la spécificité varie d'une personne à l'autre ce qui la rend tellement onéreuse. Malheureusement, l'immunothérapie n'est pas très efficace pour le patient atteint d'un CCR par rapport aux autres traitements, des efforts scientifiques supplémentaires sont donc nécessaires pour améliorer les résultats de cette thérapie vis-à-vis de ce type de cancer [16] [55].

I.10.2.2. Thérapies géniques

Avec l'avancée de la technologie scientifique, la thérapie génique est une technique qui consiste à l'insertion de gènes nécessaires dans le génome de l'hôte, tels que les gènes associés à l'expression d'anticorps, de cytokines, de récepteurs spécifiques et de ligands nécessaires. L'avantage de la thérapie génique est qu'une fois le gène spécifique transféré avec succès et inséré à l'endroit ciblé, ce dernier va induire une production continue de la molécule thérapeutique chez le patient. La sélection du système particulier d'administration du gène et le ciblage de la cellule ou de l'organe spécifique pour l'insertion sont des défis typiques de la thérapie génique. Le système d'insertion des gènes peut faire appel à des méthodes virales ou non virales. En ce qui concerne le cancer, les gènes associés à l'inhibition de l'angiogenèse et de la prolifération cellulaire et les gènes produisant des anticorps thérapeutiques peuvent être reconnus comme des cibles potentielles de la thérapie génique. Les progrès récents émergent avec l'utilisation d'outils génétiques antisens, comme les siRNA, miRNA et CRISPR-Cas9 [56].

I.10.2.3. La nanomédecine

Pour surmonter les problèmes de la chimiothérapie conventionnelle ne visant pas spécifiquement les cellules cancéreuses, de nouvelles approches d'administration de médicaments ont été introduites. Les objectifs des nouvelles approches sont de cibler uniquement les cellules cancéreuses, de réduire le nombre de médicaments anticancéreux et d'avoir une absorption et une élimination appropriées du médicament. L'avancement dans les nouvelles approches impliquent l'utilisation de nanoparticules (NP) d'une taille de 1 à 100 nm, transportant à leur surface ou par encapsulation des molécules anticancéreuses. Cela permet une meilleure distribution du traitement au niveau de la tumeur et une diminution des effets secondaires.

Les NP peuvent être des micelles, des polymères, des liposomes, des nanocristaux et des dendrimères, des nanoparticules d'or ou de silice etc. L'attention portée aux NP est due à leur biocompatibilité, leur petite taille, leur grande surface, leur nature non toxique et leur capacité à se conjuguer avec les différents groupes fonctionnels pour cibler la cellule cancéreuse spécifiquement.

Pour une administration efficace et spécifique du médicament anticancéreux à la tumeur, les NP sont conjuguées à un ligand ou à un récepteur particulier (pouvant inclure des peptides, des fragments d'anticorps et des anticorps monoclonaux), qui sont surexprimés sur les cellules cancéreuses. Bien que le 5-FU soit resté le traitement de première intention du CCR, il présente certains inconvénients tels qu'une mauvaise absorption, une action non ciblée sur le corps (impact sur les cellules saines) et une courte demi-vie. Pour surmonter ces limitations du 5-FU, les chercheurs ont créé un copolymère à base de méthacrylique sensible au pH pour le revêtement du médicament afin d'augmenter la demi-vie et l'absorption au niveau de la cible spécifique. De même, les nanoparticules de liposomes (LNP) sont couramment utilisées pour l'administration de médicaments anticancéreux spécifiques au site et actuellement pour le traitement du CCR. Pour faire progresser davantage l'administration de médicaments pour le traitement du cancer du côlon, les oxydes métalliques, les nanotubes de carbone et les dendrimères sont en phase de développement [57].

I.10.2.4. Thérapie Laser

Ces dernières années, nous avons constaté un intérêt croissant pour les NP à buts diagnostiques ou thérapeutiques. Certains chercheurs se sont concentrés sur l'amélioration des systèmes d'administration de médicaments et sur l'obtention de concentrations plus élevées de médicaments sur le site de la maladie avec une réduction de la toxicité. Plus récemment, une nouvelle stratégie thérapeutique anticancéreuse avec pour objectif la diminution drastique des effets secondaires des traitements conventionnels tente de se développer. Cette méthode thérapeutique repose sur l'utilisation d'une nouvelle source d'énergie, la lumière, on parle de thérapie laser. Cette technique se rassemble autour de deux axes. Premièrement, la thérapie photothermique (PTT), c'est une stratégie impliquant l'hyperthermie médiée associée à des nanoparticules. Après administration et accumulation intra-tumorale, ces nanoparticules sont illuminées par une lumière de longueur d'onde adéquate. Les électrons de la bande de

conduction des NPs subissent alors des oscillations synchronisées, convertissant la lumière proche de l'infrarouge (NIR) en chaleur, qui finit par tuer les cellules cancéreuses. Deuxièmement, la thérapie laser comprend également la thérapie photodynamique (PDT) qui permet d'une part le traitement anticancéreux et d'autre part le photodiagnostic (PD) favorisant ainsi une meilleure détection des cellules cancéreuses. 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. 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 récurrence ou de résistance aux chimiothérapies actuelles (**Figure 25**) [58] [59].

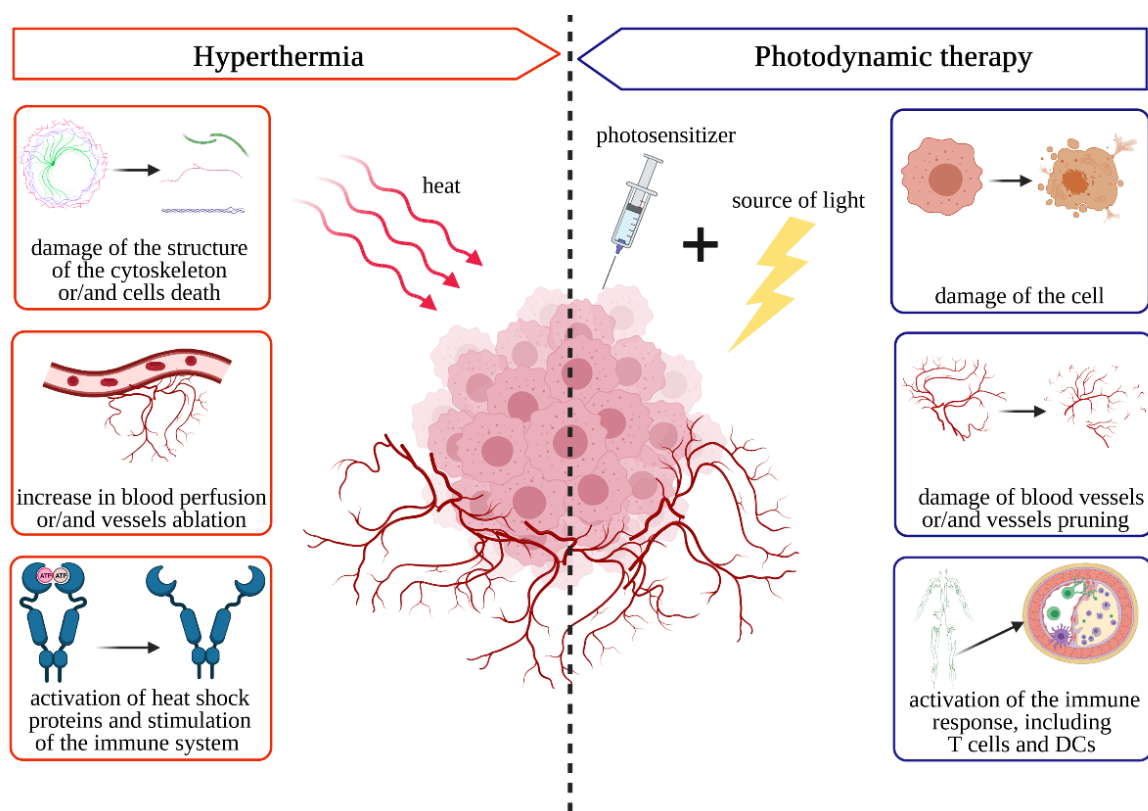


Figure 25 : Thérapie Laser pour le traitement du cancer colorectal [59]

Chapitre II. Thérapie photodynamique

II.1. Principe de la thérapie photodynamique

La thérapie photodynamique (PDT) est une procédure thérapeutique peu invasive approuvée cliniquement qui peut exercer une activité cytotoxique sélective vis-à-vis des cellules tumorales dans le but de leur destruction tout en préservant les tissus sains avoisinants et ainsi limitant les effets secondaires. La procédure implique l'administration d'un agent photosensibilisant, ou photoactif (actif par la lumière) appelé le "photosensibilisateur" (PS) dénué de toute toxicité à l'obscurité. Une fois le PS capté par les cellules cancéreuses, il s'en suit une irradiation à une longueur d'onde correspondant à sa bande d'absorbance [60].

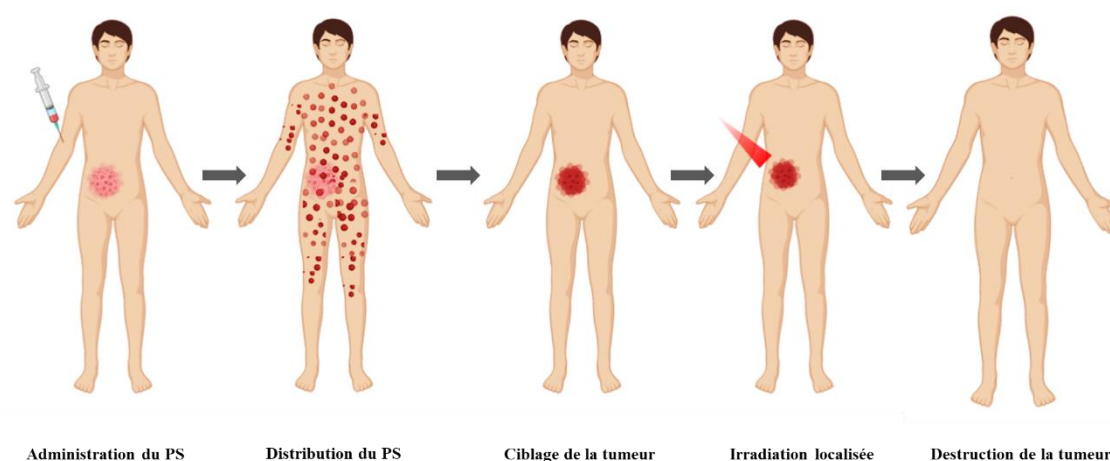


Figure 26 : Principe de la thérapie photodynamique
Créée par J.M via Biorender.com

[61]

L'un des principaux défis du traitement du cancer consiste à cibler spécifiquement les cellules cancéreuses et à épargner les tissus sains. La PDT est en passe de devenir un nouveau moyen d'exérèse des tissus pathologiques. En effet, sa sélectivité résulte d'une part du caractère localisé de l'irradiation destinée à activer le PS, et d'autre part de l'incorporation préférentielle de ce dernier dans les tissus ciblés. Ceci permet de traiter des petites lésions connues mais de localisation imprécise donc par conséquent de limiter fortement les effets secondaires indésirables en comparaison avec les traitements chimiothérapeutiques conventionnels. Outre la préservation des tissus sains, la PDT présente un principal avantage, qui se traduit notamment en termes de potentiel d'amélioration de la qualité de vie des patients [62].

II.2. Les mécanismes de la PDT

Au fil des années, le diagnostic et la PDT sont apparus comme des procédures diagnostiques et thérapeutiques prometteuses pour la plupart des cancers. Ces deux modalités utilisent un principe théranostique commun qui implique l'utilisation des PS et leur excitation par la lumière visible ou celle proche de l'infrarouge. En outre, les modalités peuvent, en principe, être facilement combinées dans un seul et même régime théranostique unique. La détection précoce du cancer et précisément du CCR est une mesure importante qui peut améliorer le pourcentage de survie des patients et, par la suite, prévenir les métastases.

Le diagnostic photodynamique (PDD) est une technique innovante et non conventionnelle basée sur l'utilisation de la lumière. C'est une approche photodynamique intégrative, dans laquelle le PS est administré au patient et absorbé principalement par les cellules tumorales. Cette absorption sélective du PS dans les cellules tumorales est due à l'effet de perméabilité et de rétention accru (EPR). Comme les tumeurs présentent une vascularisation non étanche, un mauvais drainage lymphatique et une perméabilité accrue des vaisseaux, ces facteurs permettent aux médicaments macromoléculaires (tels que les PS) de s'accumuler davantage dans les tumeurs que dans les tissus sains. Une fois absorbé par les cellules cancéreuses, le PS est photoactivé par une source de lumière visible d'une longueur d'onde précise comme par exemple la lumière bleue (330 à 400 nm), et l'excitation du PS le fera apparaître par fluorescence. Cela permet d'éclairer les cellules tumorales identifiées par le PS, sans causer de dommages cellulaires ou tissulaires, et permet ainsi d'identifier facilement une lésion précancéreuse ou cancéreuse. Comme la plupart des PS s'accumulent de préférence dans les tissus tumoraux et certains ont des caractéristiques excitables dans la région bleue visible, cette méthode de PDD peut permettre alors de visualiser et de détecter facilement les cellules tumorales, donnant ainsi un diagnostic ponctuel et un traitement plus efficace. Le principe de la PDD se recoupe avec les approches classiques de la chirurgie guidée par fluorescence (**Figure 27**). En effet, un des meilleurs exemples du principe de PDD utilisé sur le CCR a été réalisé avec l'acide 5-aminolévulinique (5-ALA) et ses dérivés comme agents photosensibilisateurs. Le 5-ALA est un précurseur limitant la vitesse de synthèse de l'hème, qui est métabolisé en protoporphyrine (Pp, un PS). Ensuite, la ferrochélatase insère le fer ferreux dans la PpIX pour former l'hème, qui n'est pas fluorescent et n'a pas de propriété photosensibilisante. Bien que la synthèse de l'hème puisse se produire dans la plupart des types de cellules, l'administration de 5-ALA exogène entraîne une accumulation de PpIX dans les cellules cancéreuses avec une spécificité remarquable. La PpIX est un puissant PS qui présente une forte absorption autour de 409 nm, et une efficacité moindre à 505 nm. Après excitation, la fluorescence est émise à 635 nm et 705 nm. Ces propriétés fluorescentes sont très utiles pour l'identification des tissus cancéreux lors d'une opération chirurgicale facilitant ainsi la résection précise et plus complète des tissus cancéreux guidée par fluorescence [63] [64].

De même, une autre étude utilisant cette fois-ci la fluorescéine a démontré une résection complète dans plus de 80% des patients traités [65]. Des études cliniques détaillent, 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 [66] ou des cancers du sein [67]. En effet, une faible injection intraveineuse de bleu de méthylène a permis de détecter des adénomes parathyroïdiens indétectables sans cette méthode [68]. L'utilisation de la fluorescence du vert d'indocyanine a permis également de montrer des lésions cancéreuses du sein indétectables par palpation [69].

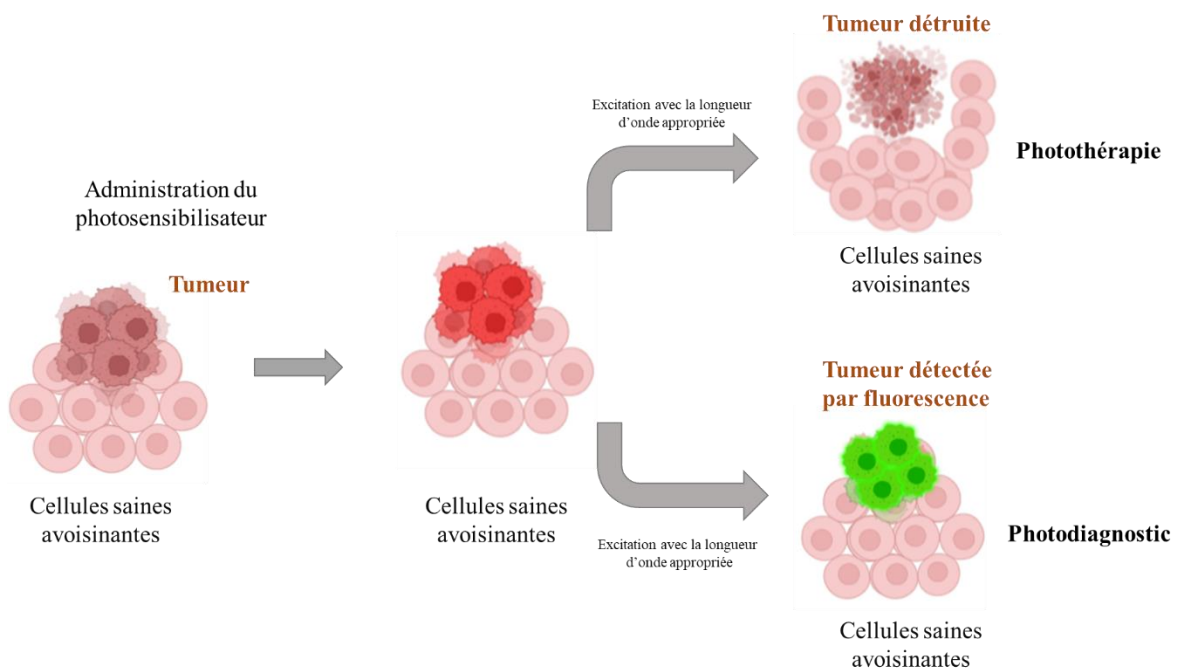


Figure 27 : Principe des 2 volets de la PDT : la photothérapie et le photodiagnostic [70]
Créée par J.M via Biorender.com

En ce qui concerne la PDT, c'est une stratégie thérapeutique non conventionnelle, innovante et prometteuse contre le cancer, consistant à la destruction sélective des tissus cancéreux par un mécanisme d'oxydation irréversible. La PDT est actuellement une modalité de traitement non intrusive utilisée pour traiter de nombreux types de cancers permettant ainsi d'obtenir de meilleurs résultats thérapeutiques en la comparant aux stratégies conventionnelles existantes. Elle intègre trois composants essentiels : tout d'abord un produit chimique photoactif appelé le PS qui s'accumule sélectivement dans les cellules/tissus cancéreux discriminés et qui, lorsqu'il est excité par une source de lumière spécifique dans la région de longueur d'onde rouge/proche infrarouge de 600 à 800 nm, produit un mécanisme de réaction photochimique avec l'oxygène moléculaire de la tumeur environnante pour générer de l'oxygène moléculaire singulet cytotoxique et d'autres espèces réactives de l'oxygène (ERO). Le succès de ce mécanisme d'action photochimique de la PDT dépend fortement de la concentration et de l'accumulation subcellulaire spécifiquement ciblée des PS dans les tissus tumoraux. Selon leur mode d'administration, on peut distinguer deux types de PDT. Premièrement, la PDT topique utilisant un PS en application locale (crème, émulsion, solution, injection sous-cutanée) et

deuxièmement la PDT systémique pour laquelle le PS est administré par voie intraveineuse ou par voie orale. Dans les deux cas, après administration, le PS est concentré sélectivement au sein du tissu cancéreux.

En comparant ces deux types de PDT, on remarque que la PDT systémique montre une faible sélectivité du PS à l'origine d'une photosensibilité généralisée et prolongée des patients traités. Alors que pour la PDT topique, l'application locale du PS a permis de nouvelles perspectives d'utilisation de la PDT dans de nombreux domaines médicaux et chirurgicaux, notamment en cancérologie et plus précisément en dermatologie. Néanmoins, du fait du large éventail d'avantages de la PDT face aux thérapies anticancéreuses actuelles, la recherche tend à améliorer la sélectivité des PS en vue d'étendre les champs d'application de la PDT aux tumeurs solides plus profondes [71].

II.3. Les mécanismes photophysiques et photochimiques de la PDT

L'interaction de la lumière avec la matière donne lieu à une multitude de phénomènes physiques et chimiques qui appartiennent à deux domaines voisins, la photophysique et la photochimie. L'étude des processus physiques de l'interaction lumière-matière relève de la photophysique, alors que l'étude des transformations chimiques induites par la lumière est du domaine de la photochimie proprement dite. La photophysique et la photochimie sont les sciences qui traitent l'ensemble des processus physico-chimiques produits par action de la lumière s'étendant de l'infrarouge proche à l'ultraviolet, en incluant le visible [72].

En effet, la PDT exploite la puissance de la lumière visible pour produire des agents cytotoxiques de manière contrôlée dans l'espace et dans le temps dans le but d'endommager spécifiquement les cellules et les tissus tumoraux ciblés. Pour que des réactions photodynamiques se produisent, le PS doit absorber au moins un photon pour être promu à un état excité à durée de vie suffisamment longue, puis induire des réactions photodynamiques dans un environnement oxygéné (**Figure 28**). Ces propriétés garantissent que la PDT a un spectre d'action exceptionnellement large contre les tumeurs.

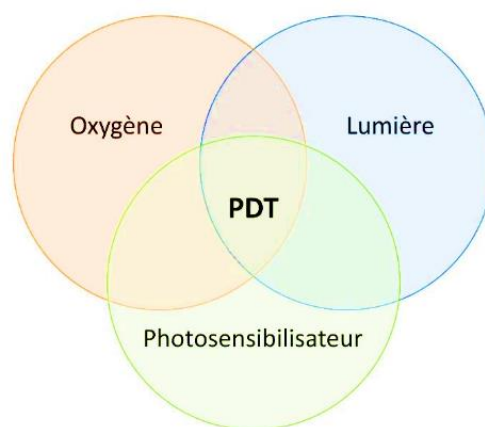


Figure 28 : Les trois éléments essentiels de la PDT [44]

La photosensibilisation du PS par absorption de lumière ($h\nu$) va induire le passage du PS de son état fondamental (P_0) à un état singulet excité (nP^*) généralement instable avec une durée de vie très courte et peut rapidement revenir à son état fondamental via divers processus possibles de désactivation. Ceux-ci peuvent être des processus photophysiques avec ou sans émission de photons, ou des réactions photochimiques conduisant à la production de nouvelles espèces moléculaires, comme les ERO générées par des réactions photodynamiques. Chaque molécule photosensible a une probabilité caractéristique de subir chaque processus, et elle peut être influencée par des solvants et d'autres molécules présentes dans son environnement (**Figure 29**) [73].

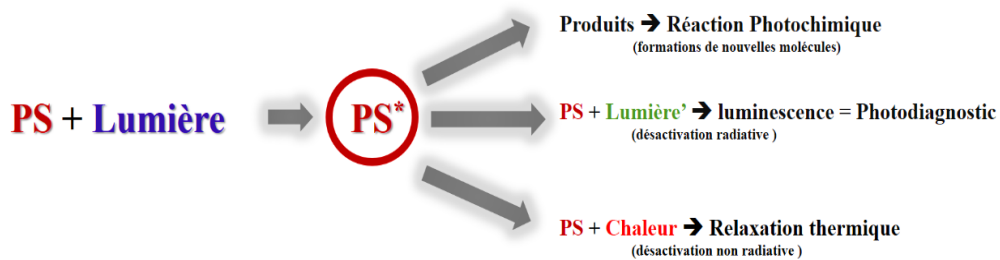


Figure 29 : Processus photochimiques d'activation du PS en présence de lumière [72]

Après excitation du PS, il se trouve dans un état électronique excité singulet S_n , il se produit très rapidement une relaxation vibrationnelle qui lui fait perdre une partie de son énergie photonique. Le PS excité passe très rapidement à un niveau plus bas S_1 .

A ce niveau-là, on a alors une compétition entre plusieurs types de processus :

Soit un processus radiatif se traduisant par de la fluorescence, soit deux processus non radiatifs qui se manifestent pour l'un par une conversion interne, permettant une transition non radiative qui fait passer le PS de S_2 à S_1 puis de S_1 à S_0 . Pour l'autre, cela fait intervenir une conversion intersystème, qui est une transition non radiative permettant le passage de S_1 à T_1 dans un état vibrationnel excité, et de T_1 à S_0 , également dans ce même état vibrationnel. Une fois passé par ce processus de conversion intersystème, l'état triplet peut lui aussi se désactiver par des processus radiatifs (phosphorescence) ou non radiatifs (conversion intersystème T_1 vers S_0). Alors que la fluorescence est une transition permise entre états de même spin, la phosphorescence est une transition interdite car ayant lieu entre états de spins différents. En conséquence, la fluorescence est un phénomène rapide et intense, la phosphorescence est un phénomène lent, qui peut durer jusqu'à plusieurs secondes alors que la source d'excitation est éteinte ; c'est aussi une émission de faible intensité parce qu'un autre processus non radiatif entre en compétition avec elle (**Figure 30**) [74].

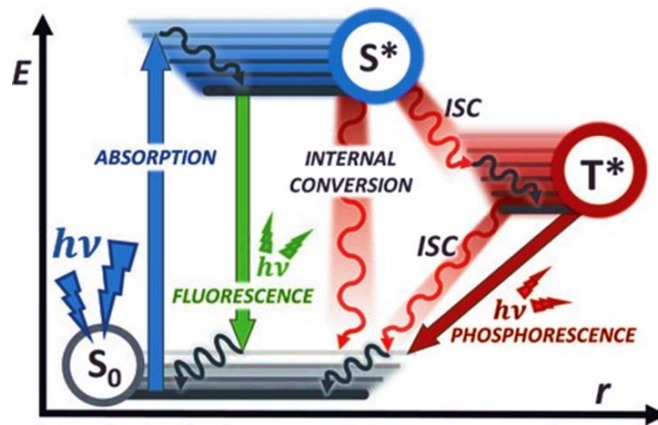


Figure 30 : Diagramme de Jablonski illustrant les processus photophysiques possibles. [72]

L'état triplet T_1 peut en effet se désactiver vers l'état fondamental S_0 par conversion inter-système. Malgré ces différentes voies de désactivation, relativement lentes, l'état triplet T_1 a toujours une durée de vie plus longue que l'état S_1 . Cette durée de vie va lui permettre d'interagir préférentiellement avec des substrats ou des molécules qui sont des singulets à l'état fondamental, présents dans son environnement. Un de ces substrats qui a d'importance pratique dans ce phénomène photochimique est le dioxygène moléculaire (O_2). Par conséquent, les interactions moléculaires entre PS à l'état excité et O_2 à l'état fondamental constituent un processus remarquablement favorisé sur lequel reposent principalement les réactions photodynamiques (Figure 31).

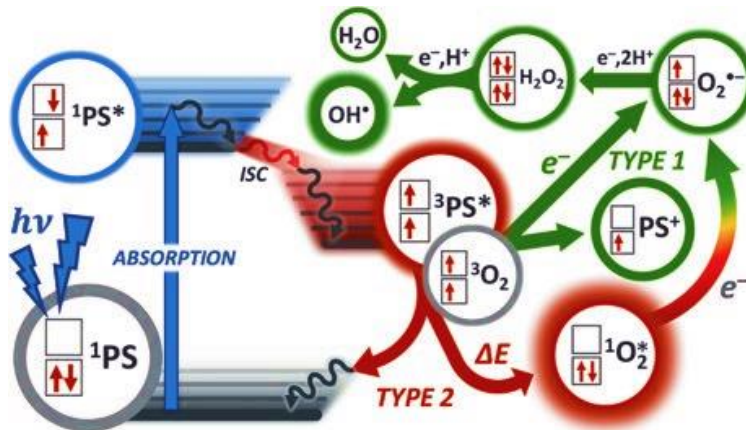


Figure 31 : Illustration schématique des principales transitions et réactions directement impliquées dans les réactions photodynamiques. [72]

Au-delà de cette interaction, lorsque le PS à l'état triplet excité ($^3PS^*$) rencontre de l'oxygène à l'état fondamental du triplet (3O_2), deux principaux types de réaction 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 [75].

- Dans les réactions de type I, le PS à l'état triplet excité ($^3\text{PS}^*$) donne un électron à l'oxygène triplet ($^3\text{O}_2$) pour produire un anion radical superoxyde (O_2^-).
- Les réactions de type II produisent de l'oxygène singulet ($^1\text{O}_2^*$) via un don d'énergie de $^3\text{PS}^*$ à $^3\text{O}_2$ (**Figure 32**).

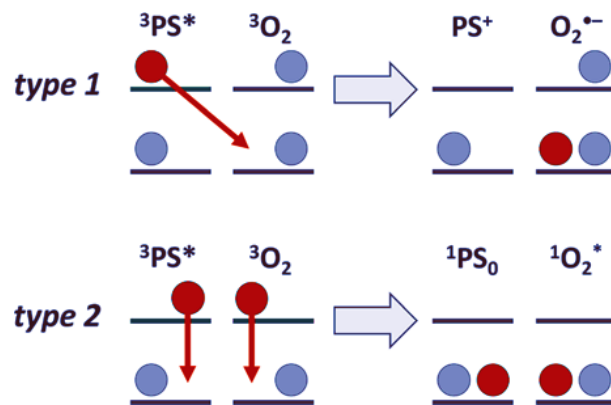


Figure 32 : Illustration des transitions électroniques des réactions photodynamiques [72]

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 (H^+) à l'origine de la production d'espèces radicalaires. Les formes oxydées du PS (P^*) ou du substrat (S^*) ainsi que leurs formes semi-réduites (P^- et S^-) peuvent réagir avec l'oxygène moléculaire environnant et former respectivement des radicaux peroxydes à l'origine d'une chaîne d'auto-oxydation et de l'anion superoxyde (O_2^-). Bien que cette espèce ne soit pas particulièrement réactive, elle peut interagir avec d'autres substrats pour former d'autres ERO tels que le radical hydroperoxyde (HO_2^*), le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et le radical hydroxyle ($\cdot\text{OH}$). 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 [76].

II.3.2. Les réactions photochimiques de type II

Dans les réactions photochimiques de type II, cette fois-ci l'oxygène entre en réaction directement 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 induisant surtout la formation de l'oxygène singulet. De par sa forte réactivité, l'oxygène singulet réagit avec un grand nombre de substrats biologiques provoquant des dommages oxydatifs aboutissant à la mort cellulaire [77].

Les réactions de type I et de type II peuvent se produire simultanément. Cependant, la réaction de type II apparaît majoritairement en PDT antitumorale. La cytotoxicité induite par la PDT est donc principalement le résultat de phénomènes d'oxydation entraînant la dégradation des acides aminés (histidine, tryptophane, méthionine) et des lipides composant les membranes cellulaires et les mitochondries (cholestérol, phospholipides) [78].

II.4. Le photoblanchiment ou la photomodification des PS

Comme déjà expliqué précédemment, l'oxygène singulet $^1\text{O}_2$ possède une durée de vie très courte mais une très grande réactivité, de ce fait il est susceptible de réagir avec des substrats cellulaires situés dans son environnement proche conduisant à la production des ERO responsables de la mort cellulaire. De façon similaire, les molécules d'oxygène peuvent réagir avec les photosensibilisateurs en provoquant leur dégradation, ce phénomène est connu sous le nom de photoblanchiment (PB) ou photomodification. En effet, il existe 2 mécanismes de PB : 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 photoproduits peu ou incapables d'absorber la lumière. Alors que dans le cas 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, ou par 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 photoproduits pouvant eux-mêmes servir de photosensibilisateurs.

Ce phénomène de PB constitue un problème fondamental dans la PDT en provoquant la diminution de la concentration des PS administrés dans la zone tumorale. Heureusement que les PS s'accumulent préférentiellement dans les tissus tumoraux que dans les tissus sains, de ce fait ce problème peut être contourné en augmentant la dose d'irradiation dans des zones bien localisées de manière à préserver les zones saines [79] [80].

II.5. Les Photosensibilisateurs

La PDT a été découverte il y a plus de 100 ans lorsqu'il a été observé que certains colorants pouvaient tuer des micro-organismes en étant exposés à la lumière en présence d'oxygène. Depuis ces premiers jours, la PDT a été principalement développée en tant que thérapie anticancéreuse, avec des autorisations réglementaires et des essais cliniques en accumulation régulière pour différents types de cancer et différentes structures de PS. Une étape très importante pour la PDT a été l'introduction du 5-ALA, qui fonctionne comme un promédicament afin d'induire la biosynthèse endogène de la porphyrine qui agit à son tour comme un PS endogène produit par nos cellules. La PDT avec le 5-ALA et ses dérivés sont

devenus les piliers de la pratique de dermatologie clinique couvrant un champ énorme de pathologies comme le cancer de la peau, les lésions précancéreuses et les acnés. Une autre étape importante dans le développement de la PDT a été la prise de conscience que la PDT pouvait également être utilisée comme modalité antimicrobienne efficace en traitement potentiel des infections localisées (**Figure 33**) [81] [82].

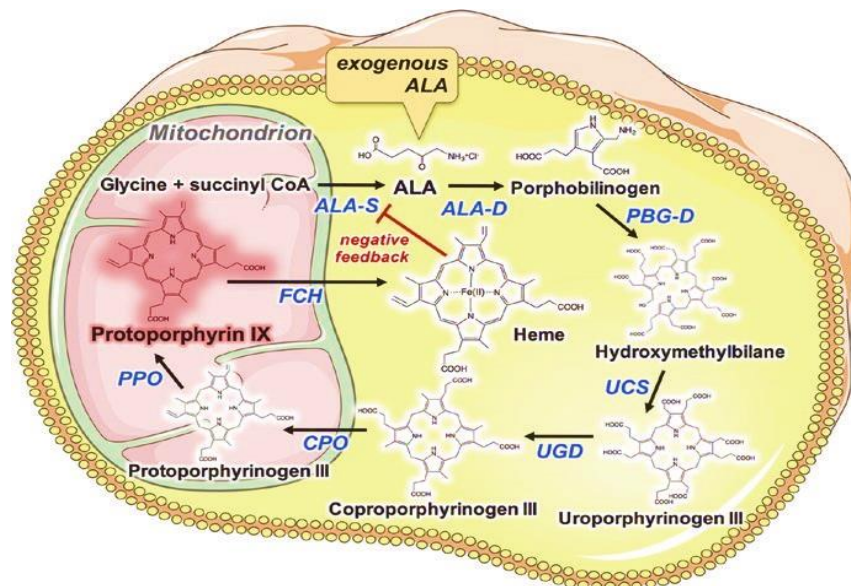


Figure 33 : Cycle de biosynthèse de l'hème et rôle de la PpIX induite par l'ALA [83]

La principale enzyme de la biosynthèse de l'hème, l'ALA synthase, est l'enzyme clé dans la régulation de cette biosynthèse. Elle assure la formation des précurseurs des porphyrines (5-ALA et porphobilinogène), la formation du porphyrinogène, puis des porphyrines pour aboutir à la production d'hème par incorporation d'un atome de fer. ALA-S : ALA synthase, ALA-D : ALA déshydratase, PBG-D : porphobilinogène désaminase, UCS : uroporphyrinogène synthase, UGD : uroporphyrinogène décarboxylase, CPO : coproporphyrinogène-oxydase, PPO : protoporphyrinogène oxydase, FCH : ferrochélatase.

Une deuxième étape majeure dans le développement de la PDT a été son introduction en tant que traitement clinique de la néo-vascularisation choroïdienne secondaire à la dégénérescence maculaire liée à l'âge. Le PS appelé Visudyne (dérivé de la benzoporphyrine) a été injecté par voie intraveineuse, et peu de temps après, une lumière rouge a été projetée à l'arrière de l'œil afin de détruire les vaisseaux sanguins proliférant dans la rétine [84].

II.5.1. Caractéristiques importantes des PS

L'efficacité de la PDT contre le cancer repose principalement sur le choix du PS utilisé afin de permettre une photosensibilisation efficace. Le PS idéal doit donc répondre à plusieurs critères :

- 1- Le PS doit avoir de faibles niveaux de toxicité à l'obscurité pour l'organisme et une faible probabilité d'effets pharmacologiques indésirables lors de l'administration tels que l'hypotension (diminution de la pression artérielle) ou des réactions allergiques.
Le PS doit absorber la lumière dans les régions de longueur d'onde rouge ou rouge lointain afin que l'effet endommageant les tissus soit aussi profond que possible. Il est

connu que l'absorbance et la diffusion de la lumière sont minimisées à des longueurs d'onde plus longues qui pénètrent plus profondément dans les tissus. Les bandes d'absorption à des longueurs d'onde plus courtes pénètrent moins dans les tissus et sont plus susceptibles d'entraîner une photosensibilité cutanée (**Figure 34**). Les bandes d'absorption à des longueurs d'onde trop élevées (> 800 nm) signifient que les photons n'auront pas suffisamment d'énergie pour promouvoir les PS à l'état triplet excité pour permettre le transfert d'énergie à la molécule d'oxygène à l'état fondamental pour l'exciter à l'état singulet.

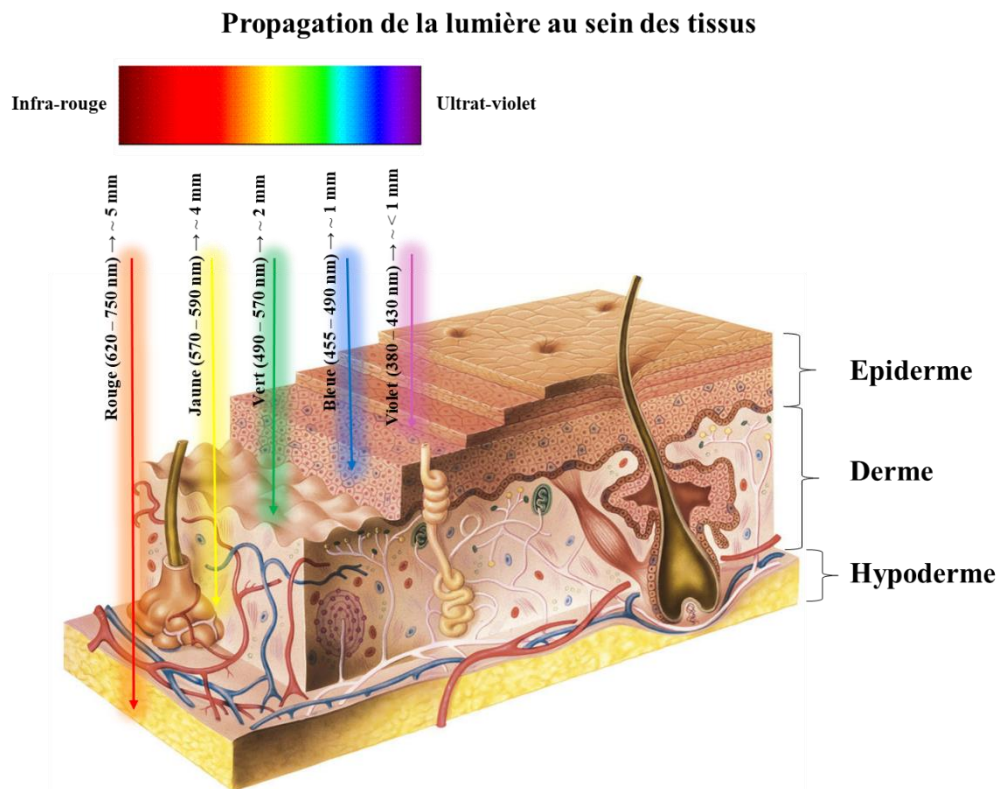


Figure 34 : Propagation de la lumière de différentes longueurs d'onde dans les tissus. [85]
Créée par J.M via Biorender.com

- 2- Il doit avoir des bandes d'absorption relativement élevées pour minimiser la dose de PS et de lumière nécessaire pour obtenir l'effet souhaité.
- 3- La synthèse du PS doit être relativement facile et les matières premières facilement disponibles pour rendre possible une production à grande échelle.
- 4- Le PS doit être un composé pur avec une composition constante et une durée de conservation stable et être idéalement soluble dans l'eau ou soluble dans un véhicule d'administration de médicament biocompatible.
- 5- Il ne doit pas s'agréger indûment dans les environnements biologiques car cela réduit son efficacité photochimique.
- 6- L'élimination pharmacocinétique du patient doit être rapide, c'est-à-dire inférieure à 1 jour pour éviter la nécessité d'une protection post-traitement contre l'exposition à la lumière en raison d'une photosensibilité prolongée de la peau.

- 7- Un court intervalle entre l'injection et l'illumination est souhaitable pour faciliter un traitement ambulatoire qui soit à la fois convivial pour le patient et rentable.
- 8- Pour le traitement du cancer, un PS idéal devrait s'accumuler sélectivement dans les tumeurs après injection intraveineuse. Bien que les mécanismes exacts de cet " effet de localisation des tumeurs " ne soient pas complètement compris, certains PS peuvent atteindre une accumulation de 5:1 ou plus dans les tumeurs par rapport au tissu sain environnant [72] [83] [86] [87].

Bien qu'une activité PDT élevée soit généralement considérée comme un avantage, il est possible d'avoir un PS excessivement puissant qui est parfois considéré comme "impitoyable". Avec des limitations dans l'efficacité du PS et de la photo-dosimétrie, le PS hautement actif peut facilement permettre un surdosage du traitement lorsque le tissu normal environnant est endommagé ainsi que la tumeur cible formant de vastes zones nécrotiques.

II.5.2. Structures principales des PS

Les PS généralement utilisés dans le traitement anticancéreux sont classés en deux grandes catégories : les dérivés non tétrapyrroliques et les PS tétrapyrroliques. Ces derniers peuvent eux-mêmes être divisés en 3 sous-catégories connues sous le terme de générations, on parle alors de PS de première génération qui correspondent aux molécules naturelles, de deuxième génération qui sont les molécules synthétiques et les PS de troisième génération correspondant aux PS vectorisés [83].

II.5.2.1. PS tétrapyrroliques

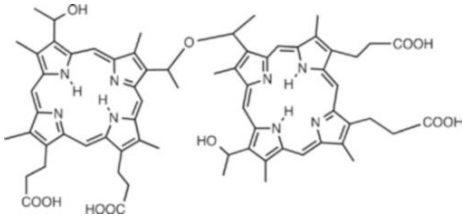
II.5.2.1.1. Les PS de première génération

La classe des PS tétrapyrroliques contient le plus grand nombre de composés qui ont été explorés en tant que PS pour la PDT à la fois en laboratoire et également approuvés et testés cliniquement. Les quatre structures les plus explorées sont les porphyrines, les chlorines, les bactériochlorines et les phtalocyanines.

Les premiers PS tétrapyrroliques utilisés en PDT sont obtenus à partir de l'hémoglobine. Le dérivé d'hématoporphyrine connu plus tard sous le nom commercial de Photofrin® et Photogem® a été approuvé en 1990 et reste aujourd'hui le plus largement utilisé en tant que PS en PDT clinique. Connu également sous le nom de porfimère sodique ou dihématoporphyrine éther, le Photofrin® a prouvé une photocytotoxicité efficace pour le traitement de nombreux cancers solides tels que les cancers cutanés, du poumon, de l'œsophage et de la vessie. Cependant, ce PS a été retiré du marché en 2012, car il présente de nombreux inconvénients. Tout d'abord, ce composé n'est pas pur, et il est composé d'un mélange complexe de porphyrines mal défini et difficile à reproduire. Le Photofrin® présente également une faible absorbance dans le rouge, ce qui limite son utilisation aux tumeurs superficielles. De plus, son

manque de sélectivité pour les cellules cancéreuses, associé à une faible clairance, entraîne une photosensibilisation cutanée des patients après traitement. Afin de pallier les inconvénients des PS de première génération, et se rapprocher le plus possible des caractéristiques du PS idéal, de nouveaux PS, dits de 2^{ème} génération, ont été développés (**Tableau 5**) [88] [89].

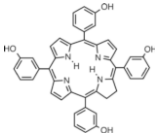
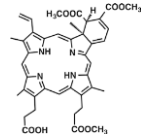
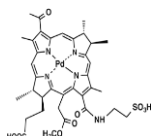
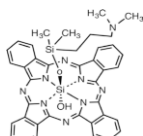
Tableau 5 : Exemple de porphyrine utilisée contre le cancer.

Classe	Nom	Structure	λ_{max} (nm)	Application	Références
Porphyrine	Photofrin hematoporphyrin derivative (HpD)		630	Cancer de la vessie, poumon, œsophage et cerveau	[87][90]

II.5.2.1.2. 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. Au contraire des PS de première génération, ces PS sont des composés purs. 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, ces composés possèdent un rendement quantique en oxygène singulet élevé augmentant alors l'effet anticancéreux de la PDT et une clairance bien plus importante que les PS de première génération, limitant ainsi la phototoxicité associée à la génération précédente. De plus, ces molécules sont plus rapidement éliminées de l'organisme, limitant la période de photosensibilisation cutanée. Ces PS sont principalement des dérivés de porphyrine, chlorine ou phtalocyanine (**Tableau 6**) [83] [91].

Tableau 6 : Exemples de PS de deuxième génération

Classe	Nom	Structure	λ_{max} (nm)	Application	Références
Chlorine	Foscan m-tetrahydroxyphenylchlorin (mTHPC)		652	Cancers de la tête et du cou	[88] [92]
Chlorine	Visudyne or verteporfin / Benzoporphyrin derivative (BPD)		690	Dégénérescence maculaire liée à l'âge	[88] [93]
Bactéριοchlorine	TOOKAD® (WST-11)		753	Cancer de la prostate	[88] [94]
Phthalocyanine (Pc)	Silicon phthalocyanine (Pc4)		675	Cancers de l'estomac, peau, lèvre, cavité buccale, langue et sein	[88] [95]

II.5.2.1.3. 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 ont subi des modifications chimiques consistant à les substituer par des motifs chimiques qui peuvent être spécifiquement reconnus par les cellules tumorales. Cela repose sur la conjugaison covalente de PS à divers ligands de ciblage (macromolécules ou petites molécules) qui présentent une capacité de reconnaissance moléculaire spécifique avec un récepteur apparenté qui est surexprimé sur la tumeur ou d'autres cellules d'intérêt. Ces motifs sont généralement des biomolécules : des stéroïdes, des sucres, des amines, des vitamines ou des anticorps.

De plus, les cellules tumorales possèdent à leur surface des antigènes spécifiques non retrouvés au niveau des cellules saines, ce qui permet l'utilisation d'anticorps dirigés contre ces antigènes spécifiques comme vecteurs pour augmenter l'efficacité de ciblage des PS. Cependant, il ne faut pas omettre qu'une tumeur est un ensemble cellulaire hétérogène avec des types cellulaires possiblement insensibles à cette technologie entraînant des récives et renforçant l'intérêt des polythérapies. L'avantage principal de cette technique se traduit par une sélection du PS uniquement en fonction de sa génération photochimique d'ERO et de sa capacité à être

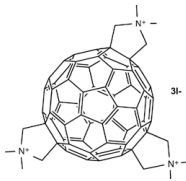
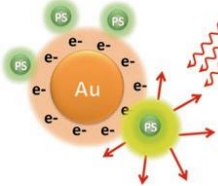
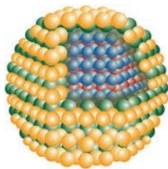
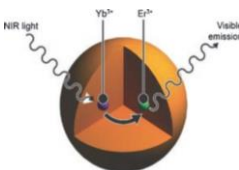
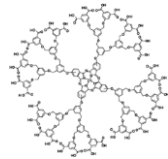
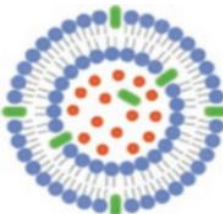
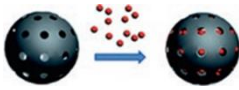
conjugué, sachant que le composant de ciblage tumoral peut être fourni par le ligand. En effet, ces substitutions chimiques reconnues spécifiquement par les cellules cancéreuses servent de vecteurs aux PS limitant fortement l'effet cytotoxique sur les cellules saines tout en décuplant l'effet anticancéreux (**Tableau 7**) [44] [70] [72].

Tableau 7 : Exemple de PS ciblés de troisième génération.

Classe	Ligand	Ciblage	PS	Application	Références
Anticorps monoclonal	OC125	Cancer de l'ovaire	Chlorine	Cancer	[96]
Peptides	Octréotide	Récepteur de somatostatine	Chlorine	Leucémie	[97]
Lipoprotéines	Low-density lipoprotein (LDL)	Récepteur LDL	Tetra- <i>t</i> -butyl silicon phthalocyanine	Cancer, athéroscléroses	[98]
Sérum protéines	Albumine modifiée	Récepteur Scavenger	Chlorine	Athéroscléroses	[99]
Vitamines	Acide folique	Récepteur Folate	Phéophorbide a	Cancer	[100]
Stéroïdes	Estradiol	Récepteur Stéroïdes	Phéophorbide a	Cancer du sein	[101]
Carbohydrates	Mannose	Récepteur Mannose	Meso tetraphenylporphyrine	Cancer	[102]

En plus des PS conjugués, la 3^{ème} génération regroupe les PS vectorisés et encapsulés. L'utilisation de la nanotechnologie dans la PDT peut être divisée en deux différentes approches, premièrement lorsque la nanoparticule (NP) est elle-même le PS, par exemple les fullerènes, les NPs d'or et d'argent. Dans ce cas, la NP est capable d'absorber la lumière et de prouver l'efficacité de la PDT. Deuxièmement la NP peut agir comme un système de vectorisation du principe actif qui est le PS, pour améliorer la solubilité et assurer un meilleur ciblage des sites tumoraux (dendrimères, liposomes, NP de silice mésoporeuse) (**Tableau 8**) [44] [72] [83].

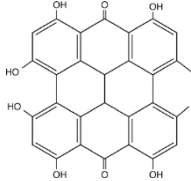
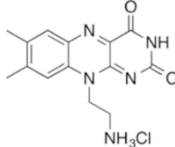
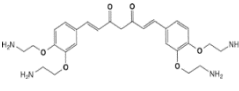
Tableau 8 : Exemple de PS nanovectorisés de la troisième génération

Classe	PS	Structure	Objectif	Application	Références
Fullerènes fonctionnalisés	BB6		Photostables, type 1	Antimicrobien	[83]
Nanoparticules d'or ou d'argent	Peut augmenter l'activité des PS conventionnels		Amélioration plasmique de la PDT	Anticancéreux	[106] [107]
Points quantiques	Polymère QD (Quantum dot) + TPP carbone QD		Solubilise le PS, génère des ROS	Anticancéreux Antimicrobien	[108] [109]
Nanoparticules à conversion ascendante	NP de terres rares/hypocrelline A		Exciter avec la lumière infrarouge proche + émission du bleu	Anticancéreux	[110]
Dendrimères	PAMAM-zinc Phtalocyanine (ZnPc)		Prévention de l'agrégation	Cancer Athérosclérose	[103]
Liposomes	Foslip (liposomal mTHPC), Fospeg PEGylée Foslip)		Solubiliser et protéger, réduire les effets secondaires	Anticancéreux	[104]
NP de silice mésoporeuse	PEI-PEG-MSN/ ZnPc		Solubiliser et protéger	Anticancéreux	[105]

II.5.2.2. Les PS non-tétrapyrroliques ou PS dérivés de produits naturels

Comme dans d'autres domaines de la médecine, il existe également un mouvement vers l'utilisation de produits naturels et l'abandon des médicaments synthétiques. L'hypothèse est que le PS dérivé d'un produit naturel présentera moins de toxicité globale et moins d'effets secondaires. Toutefois, cet argument peut présenter une faille dans la mesure où presque toutes les formes de vie ont évolué à la lumière du soleil, il est peu probable qu'elles contiennent des PS très puissants, car la phototoxicité conséquente causée par l'exposition au soleil aurait été éliminée par sélection. Bien qu'ils soient beaucoup moins étudiés que les PS tétrapyrroliques, les PS non-tétrapyrroliques provenant majoritairement des produits naturels représentent une autre approche pour la PDT. Il existe un nombre important de PS non-tétrapyrroliques utilisés en PDT comme l'hypéricine, la riboflavine et le SACUR-3 (**Tableau 9**) [83] [44].

Tableau 9 : Exemples de produits naturels utilisés comme PS.

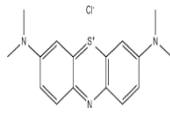
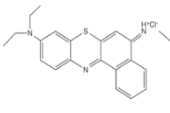
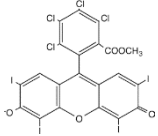
Classe	Nom	Structure	λ_{\max} (nm)	Application	Références
Perylènequinone	Hypéricine		570	Anticancéreux Antimicrobien	[111]
Flavine (vitamine B2)	Riboflavine		UVA ou 440	Antimicrobien	[112]
Curcuminoïde (épice de curcuma)	SACUR-3		420	Antimicrobien	[113]

II.5.2.2.1. PS synthétiques

Les PS synthétiques sont généralement des composés hétérocycliques conjugués présentant des bandes d'absorption élevées dans la région du spectre visible. La grande majorité de ces structures se sont avérées photostables, de sorte que ces PS pouvaient être utilisés pour la teinture de tissus et d'objets. Cependant, quelques-uns n'étant pas photostables mais dont le rendement quantique à l'état triplet était appréciable, pourraient être utilisés comme des PS pour

la PDT. Certainement, il reste quelques inquiétudes concernant ces composés synthétiques, au niveau de leur toxicité en les comparant avec les composés tétrapyrroliques. La plupart des structures ont été conçues pour être solubles dans l'eau, ce qui les rend appropriées pour les applications PDT antimicrobiennes et anti-cancéreuses. Les principaux PS synthétiques utilisés sont le bleu de méthylène, la EtNBS et le Xanthène halogéné (**Tableau 10**) [83].

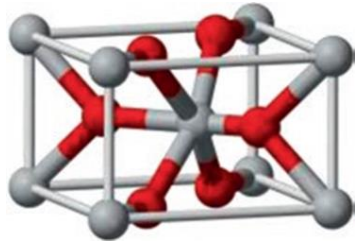
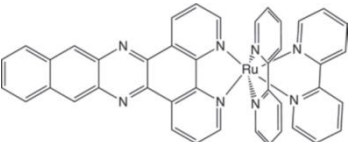
Tableau 10 : Exemples de photosensibilisateurs synthétiques

Classe	Nom	Structure	λ_{\max} (nm)	Application	Références
Phénothiazine	Bleu de méthylène		660	Anticancéreux Antimicrobien	[114]
Benzophénothiazine	EtNBS		670	Anticancéreux Antimicrobien	[115]
Xanthène halogéné	Rose Bengale		540	Anticancéreux Antimicrobien	[116]

II.5.2.2.2. Structures inorganiques

Des composés inorganiques ont parfois été signalés comme étant capables de présenter un grand effet en cas de couplage avec la PDT. Le dioxyde de titane (TiO_2) est un de ces composés. En effet, il présente une grande photostabilité et subit préférentiellement des réactions photodynamiques de type I. De même, les complexes de métaux de transition tels que $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ sont probablement les structures les plus étudiées par les photophysiciens et les photochimistes au cours des 40 dernières années. D'autres métaux comme le cobalt et le chrome sont aussi souvent utilisés dans la même optique d'efficacité. Grâce au couplage spin-orbite dû à l'effet d'atome lourd, l'efficacité du croisement intersystème est extrêmement favorisée et peut atteindre des valeurs supérieures à 99%. Cette caractéristique rend les complexes de métaux de transition particulièrement puissants en tant que PS puisque leur rendement en oxygène singulet est en général le plus élevé (**Tableau 11**) [117]

Tableau 11 : Exemples de PS inorganiques.

Classe	Nom	Structure	λ_{\max} (nm)	Application	Références
Grande bande interdite semi-conducteur	Dioxyde de titane TiO ₂		380	Antimicrobien Environnement	[83]
Complexe de métaux de transition	Ruthénium bipyridyle Ru(bpy)		450	Anticancéreux Antimicrobien	[118]

II.5.3. Pharmacocinétique des PS

Comme déjà expliqué précédemment, la PDT implique l'administration systémique ou topique d'un PS, suivie d'une irradiation de la zone cible avec une lumière de longueur d'onde correspondante à la bande d'absorption du PS. Lorsque les PS sont injectés dans la circulation sanguine, une certaine séquence d'événements se déclenche, qui peut prendre des durées très différentes selon la structure chimique des PS.

- 1- En fonction du solvant ou du véhicule utilisé pour l'injection du PS, ce dernier doit s'équilibrer avec les composants du sang circulant. Cela peut impliquer que le PS se désagrège de lui-même, qu'il soit libéré de son véhicule d'administration, ou qu'il se lie à divers composants protéiques présents dans le sérum ou aux cellules circulantes.
- 2- Les PS circulants doivent se lier aux parois des vaisseaux sanguins, et l'on pense que la nature des différents vaisseaux sanguins dans la tumeur et dans les tissus sains environnants varie considérablement en termes de taille, de vitesse du flux sanguin et de caractéristiques physiologiques telles que les pores de ces vaisseaux, et influe dans une large mesure sur les sites de localisation ou d'accumulation des PS.
- 3- Les PS vont pénétrer à travers la paroi du vaisseau sanguin à une vitesse qui dépend probablement de la force de la liaison initiale des PS à la surface épithéliale du vaisseau. En effet, les PS qui se lient fortement à la paroi du vaisseau sanguin mettront plus de temps à traverser toute la paroi, par rapport à ceux qui ont une liaison initiale plus faible présentant un passage définitivement plus rapide.
- 4- Après l'extrasation, le PS se diffuse dans le parenchyme de l'organe ou de la tumeur où il a été délivré. Si l'organe est le foie ou un autre organe métaboliquement actif, le PS peut être soumis à des modifications chimiques par les enzymes métaboliques, mais on pense que cela est plutôt improbable pour la plupart des PS à base de tétrapyrroles comme notamment, les porphyrines, les chlorines et les phtalocyanines utilisées couramment en

clinique. La localisation intracellulaire du PS dépend de plusieurs facteurs, notamment son hydrophobicité/hydrophilie, ainsi que la charge et l'asymétrie de sa structure. Les PS relativement hydrophiles, possédant des sites chargés ou polaires, sont trop polaires pour diffuser dans les membranes biologiques et sont internalisés par endocytose. En revanche, les PS hydrophobes portant peu ou pas de groupements polaires peuvent diffuser à travers les membranes plasmiques et se distribuer librement dans les membranes des différents organites cellulaires.

- 5- Le PS sera finalement éliminé du tissu. Bien que cette élimination n'ait pas été beaucoup étudiée, si le tissu contenant le PS est une tumeur ou un autre organe non métabolique, l'élimination se fera probablement par drainage lymphatique, et le PS retournera alors dans la circulation sanguine générale.
- 6- Le PS sera excrété de l'organisme, pour la majorité des PS en usage clinique, l'excrétion se fait du foie vers la bile, puis vers l'intestin où il est perdu par élimination fécale [88] [119] [120].

II.5.4. Biodistribution des PS

Il est notamment important de faire une distinction entre l'accumulation sélective et la rétention sélective tumorale des PS. La capacité de localisation tumorale des PS à la pharmacocinétique plus rapide est probablement due à une accumulation sélective dans la tumeur, tandis que la localisation des PS à la pharmacocinétique plus lente est plus probablement due à une rétention sélective. Dans le modèle d'accumulation sélective, on pense que la perméabilité vasculaire accrue aux macromolécules, typique de la néovascularisation tumorale, est principalement responsable de l'extravasation préférentielle des PS. Ces PS à action rapide se lient fréquemment à l'albumine, dont la taille et le rayon de Stokes sont idéaux pour passer à travers les "pores" de l'endothélium de la tumeur. Le modèle de rétention sélective selon lequel les PS peuvent être retenus dans les tumeurs, alors qu'ils sont éliminés des tissus et organes sains environnants, a fait l'objet de nombreuses spéculations. La sélectivité et la rétention tumorale des PS sont favorisées par deux caractéristiques des tissus tumoraux. La première concerne la surexpression des récepteurs aux lipoprotéines de basse-densité (LDL, "Low Density Lipoproteins") au niveau des cellules tumorales. En effet, le catabolisme accru du cholestérol au sein des tissus en prolifération conduit à une surexpression des récepteurs LDL. Du fait de leur composition lipidique, ces molécules sont de bons transporteurs de molécules hydrophobes. Elles ont pour rôle de fournir aux tissus le cholestérol nécessaire pour créer les membranes lors de la division cellulaire. Ainsi, les LDL peuvent assurer l'acheminement des PS hydrophobes vers les tissus néoplasiques. La seconde caractéristique qui favorise la rétention tumorale des PS est la diminution du pH dans le microenvironnement tumoral. Lorsque la tumeur grossit au-delà des limites de diffusion simple de l'oxygène, un état hypoxique intra-tumoral est généré. Ce pH acide peut modifier les propriétés physico-chimiques des PS, en particulier leur charge, et ainsi faciliter leur incorporation dans les cellules cancéreuses. Par exemple, la protonation des groupes acides carboxyliques de l'hématoporphyrine augmente son caractère lipophile favorisant son incorporation dans les cellules tumorales par simple diffusion à travers la membrane plasmique. De plus, la répartition des PS entre l'albumine et les LDL dépend du pH. Il a été montré que l'environnement tumoral

acide favorise l'association des PS avec les LDL, propice à la sélectivité et à l'accumulation tumorale des PS [88] [121] [122].

II.6. Ciblage tumoral

Le tissu tumoral comprend plusieurs anomalies anatomiques et physiopathologiques, en particulier la perméabilité vasculaire accrue et le faible drainage lymphatique, permettant le développement de stratégies plus efficaces en termes de ciblage des tumeurs. 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 PS vectorisés. 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 néovaisseaux irréguliers forment de petites cavités qui deviennent le lieu d'accumulation des PS, à cause de la déficience du système de drainage lymphatique. De même, le développement des tumeurs est généralement accompagné d'une réaction inflammatoire, caractérisée par l'arrivée de macrophages et une libération importante de cytokines conduisant à une augmentation de la perméabilité vasculaire. L'existence de ces caractéristiques physiopathologiques des vaisseaux sanguins tumoraux néoformés engendre deux méthodes de ciblage spécifiques pour viser la tumeur. En effet, les tumeurs ne possèdent pas de vaisseaux lymphatiques fonctionnels, de ce fait les PS ne sont pas évacués des petites cavités des néovaisseaux et, par un phénomène de pression favorable, ils vont pouvoir se déplacer des vaisseaux sanguins pour intégrer l'environnement tumoral, on parle alors de l' " enhanced permeability and retention effect " ou effet EPR avec un ciblage passif (**Figure 35**) [123] [124] [125].

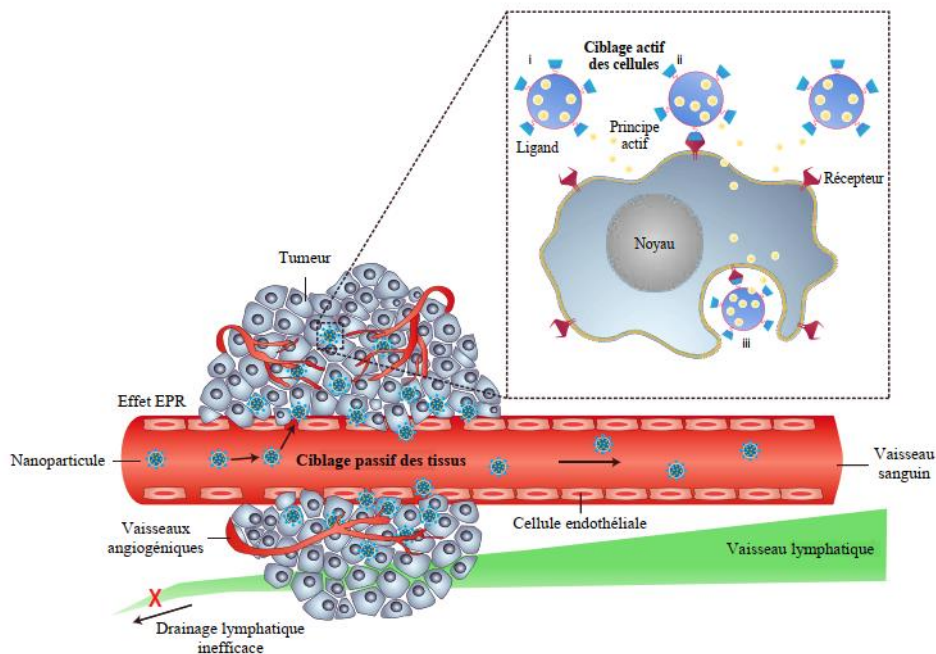


Figure 35 : Types de ciblage cellulaires

[44]

En revanche, l'effet EPR par ciblage actif est une stratégie consistant à utiliser un vecteur ou un ligand, capable de se lier spécifiquement à des antigènes ou à des récepteurs, uniquement exprimés à la surface des cellules tumorales pour éviter tout ciblage non spécifique. Le ligand peut être généralement greffé au principe actif ; le plus souvent le ligand est une biomolécule hydrophile qui va permettre d'augmenter la biodisponibilité du principe actif, souvent hydrophobe. Les ligands les plus utilisés sont des anticorps monoclonaux, des peptides, l'acide folique, des sucres ou encore des polyamines. En réalité, un grand nombre d'études précliniques réalisées sur le ciblage actif des tumeurs a permis de faire émerger différents principes généraux spécialement par PDT. Dans la majorité des cas, les PS vectorisés ciblant des récepteurs surexprimés à la surface des cellules tumorales améliorent l'efficacité antitumorale en augmentant leur internalisation cellulaire plutôt qu'en augmentant l'accumulation tumorale [126].

II.7. Vectorisation : solution pour la résistance et les limitations de la PDT

La plupart des PS utilisés en clinique ou en développement préclinique sont hydrophobes et ont tendance à s'agréger dans un environnement aqueux, alors que l'état monomère est nécessaire pour maintenir leurs propriétés photophysiques, chimiques et biologiques pour une PDT efficace. Cela limite leur délivrance et leur efficacité photosensible. En outre, l'affinité insuffisante de la plupart des PS pour les sites tumoraux entraîne également des dommages aux tissus sains après la PDT. Afin de contourner ces problèmes, il est nécessaire de mettre au point des systèmes de délivrance pour les PS afin d'assurer une administration plus sélective des sites tumoraux. Dans le cadre de la recherche permanente de l'amélioration de l'efficacité et de la sécurité de la PDT, les NPs ayant une capacité de charge élevée et une flexibilité permettant d'accueillir des PS aux propriétés physico-chimiques variables ont été mises en place. La conception d'un système efficace de vectorisation du PS nécessite la connaissance de la physicochimie de ce dernier, son application thérapeutique spécifique et les caractéristiques d'interaction du système de vectorisation avec les structures biologiques. L'intégration du PS dans son système de vectorisation nécessite de prendre en considération plusieurs propriétés très importantes autre que sa charge, telles que sa stabilité, sa solubilité, sa taille et son poids moléculaire. En effet, la vectorisation du PS engendre généralement des modifications au niveau de sa biodistribution qui renforcent habituellement l'effet EPR passif et actif. L'un ou l'autre de ces mécanismes vise à augmenter la concentration du PS au site d'action souhaité, et à réduire la toxicité de ce dernier. La vectorisation des PS pourrait être alors l'une des solutions pour améliorer l'efficacité et contourner les phénomènes de résistance et de limitation de la PDT [127] [128] [129] [130].

II.8. PDT pour les traitements des CCR

Récemment, la PDT utilisant des PS tels que des dérivés de porphyrine ou de chlorine, a reçu une attention croissante dans le traitement du CCR. La PDT, qui est un traitement alternatif du cancer, semble être une option prometteuse. En outre, le CCR étant une tumeur solide bien localisée, il représente un bon candidat du point de vue de son accessibilité pour un traitement par PDT qui peut être réalisée assez simplement par coloscopie. La PDT peut être un traitement innovant et prometteur en raison de la résistance du CCR aux traitements conventionnels. Le mécanisme moléculaire de la PDT implique une interaction simultanée entre le PS, la source de lumière de longueur d'onde appropriée et l'oxygène moléculaire. Pendant la PDT, les PS absorbent la lumière visible et convertissent l'énergie en oxygène moléculaire environnant, générant une série d'espèces d'oxygène hautement réactives [131] [132].

Selon les premières études réalisées dans les années 1980 et 1990, la PDT a produit des taux de réponse favorables ainsi qu'un bon soulagement des symptômes et une bonne récupération chez les patients atteints de CCR. En effet, la première utilisation clinique de la PDT pour le CCR revient à l'année 1986 lorsque le chirurgien mexicain Lemuel Herrera-Ornelas a utilisé des HpD de Photofrin (hematoporphyrin derivative-HPD) irradiée avec une longueur d'onde de 630 nm sur 14 patients atteints de CCR [44]. Cette étude a permis de démontrer par l'analyse des biopsies prélevées sur certains patients après leur traitement par PDT, l'éradication totale des cellules cancéreuses. Par la suite, cette étude a prouvé l'efficacité de la PDT contre le CCR en diminuant surtout les effets secondaires par rapport aux traitements conventionnels.

Après la réussite de cette première étude sur le CCR et au cours des années suivantes et jusqu'à ce jour, de nombreuses études cliniques ont été réalisées ou sont en cours avec différents objectifs relatifs à la PDT. Les études cliniques cherchent principalement à montrer l'efficacité de la PDT pour le traitement du CCR même envers les stades avancés en s'appuyant sur la possibilité de cette thérapie notamment par la coloscopie.

Une étude réalisée par Gavrina *et al.* a exploré l'efficacité de la PDT en utilisant la chlorine (Ce6) conjuguée à des NPs d'alcool polyvinylique (PVA) dans des modèles de souris xénotransplantées avec la lignée murine CT26 de CCR [133]. En utilisant l'imagerie de fluorescence *in vivo*, il a été constaté que les NPs Ce6-PVA entraînaient un ratio tumeur/normal plus élevé et un photoblanchiment plus important par rapport à l'utilisation de la Ce6 seule. Après l'examen histologique, les tumeurs CT26 ont révélé une régression plus rapide, avec une nécrose bien plus avancée après la PDT avec le complexe NPs Ce6-PVA, par rapport à la PDT-Ce6 seule. Cette étude a révélé que la vectorisation de la Ce6 dans le PVA représente une stratégie prometteuse pour augmenter la sélectivité et l'efficacité de la photo-activité de la PDT pour le traitement du CCR.

Une autre étude menée au sein de notre laboratoire par Bretin *et al.* a montré l'efficacité de la vectorisation de PS de troisième génération dans des NPs pour le ciblage tumoral par PDT sur le CCR. Cette étude repose sur l'utilisation de la 5-(4-hydroxyphényl)-10,15,20-triphénylporphyrine (TPPOH) fixée sur des nanoparticules de silice (SNPs) recouvertes de xylane (X). Les résultats ont montré une phototoxicité plus importante avec les TPPOH-X

SNPs-PDT qu'avec la TPPOH libre-PDT *in vitro* sur les lignées cellulaires humaines de CCR HT-29, HCT116 et SW620 et *in vivo* sur des modèles de souris xéno greffées [134].

Plus récemment, une étude effectuée par Simelane *et al.* a permis de montrer avec succès la création d'un système de vectorisation nanoconjugué bioactif, ZnPcS4-AuNP-S-PEG5000-NH2-Anti-GCC mAb (BNC), basé sur des AuNP PEGylés, ces systèmes ont été multifonctionnalisés avec un PS fluorescent PDT ZnPcS4 métallisé, et des mAb anti-GCC spécifiques pour le traitement par PDT. De plus ils ont été fonctionnalisés par des AcM spécifiques ciblant le GCC, afin de surmonter les défis du PDD et de la PDT du CCR *in vitro*. Le BNC final s'est avéré photostable et a montré une accumulation subcellulaire sélectivement améliorée dans le CCR ciblé, par rapport aux cellules saines *in vitro* pour un PDD réussi. En outre, le BNC final-PDT a présenté des taux de mortalité cellulaire significativement plus élevés (34%), par rapport au traitement PS-PDT seul (15%). Les résultats ci-dessus suggèrent que l'amélioration des résultats du PDD et de la PDT est due à l'accumulation spécifique de PS nanovectorisés dans les cellules du CCR cultivées *in vitro* avec un renforcement du ciblage des anti-GCC bioactifs. Par conséquent, cette plateforme BNC finale synthétisée pourrait améliorer la PDT contre le CCR, grâce à ses capacités de ciblage, et servir de mesure de diagnostic précoce simultané dans le cadre d'études ultérieures [135].

En ce moment, des recherches précliniques sont mises en place pour améliorer la performance anticancéreuse des PS existants en ciblant mieux les tumeurs, pour permettre la création de nouveaux PS plus efficaces mais également pour optimiser l'irradiation lumineuse en termes de puissance, de temps ou de systèmes d'irradiation. Néanmoins, malgré des résultats très encourageants dans certaines études, la PDT n'étant pas encore une méthode brevetée pour le traitement du CCR, les études cliniques trouvent retardées. Les résultats prometteurs des essais cliniques précédents, que ce soit pour les tumeurs de stade précoce ou pour le traitement palliatif des lésions de haut stade, la PDT reste un grand espoir pour un grand nombre de patients. La PDT, et en particulier l'utilisation de PS non toxiques, autorise des traitements répétés sans entraîner de graves effets secondaires, contrairement à la chimiothérapie ou aux autres traitements conventionnels. De plus, elle permet des interventions peu invasives à but palliatif qui peuvent prolonger la vie des patients mais également leur procurer un certain confort par rapport aux traitements traditionnels actuels.

Chapitre III. Mécanismes d'action de la PDT

III.1. Lésions moléculaires induites par la PDT

La mort cellulaire est un mécanisme majeur d'élimination des cellules dans lesquelles l'ADN est endommagé, les organites stressés ou la surexpression des oncogènes prédispose les cellules à la transformation oncogénique. Les voies qui initient et exécutent la mort cellulaire sont complexes, génétiquement codées et soumises à une régulation importante. Par conséquent, bien que ces voies soient souvent mutées en cas de malignité, il existe un intérêt considérable pour l'induction de la mort cellulaire dans les cellules tumorales en tant que thérapie anticancéreuse notamment la PDT.

En effet, la PDT génère rapidement des grandes quantités d'ERO pour induire la mort des cellules photosensibilisées. Comme nous l'avons vu précédemment, les molécules de PS excitées peuvent donner des électrons (type I) ou de l'énergie (type II) à l'état fondamental de l'oxygène pour produire soit des radicaux superoxyde (O_2^-), soit de l'oxygène singulet (1O_2). Chaque type d'ERO a une réactivité chimique caractéristique envers les différentes liaisons chimiques présentes dans les biomolécules et par conséquent, conduira à différents types de lésions cellulaires.

III.1.1. Réactions de type I

Les réactions radicalaires en chaîne ne cessent que lorsque deux espèces radicalaires réagissent entre elles par dismutation ou recombinaison. La dismutation est une réaction radicalaire classique qui peut être catalysée par des enzymes de la famille des superoxyde dismutases (SOD). Cela se produit lorsque deux molécules du même radical (par exemple O_2^-) passent par une réaction redox pour produire des produits oxydés (1O_2 ou 3O_2) et réduits l' H_2O_2 . Dans les réactions de recombinaison, deux molécules du même radical ou de radicaux différents réagissent pour former un dimère lié par covalence des deux radicaux.

La peroxydation lipidique représente une source critique de dommages cellulaires qui conduit souvent à la nécrose. Étant donné que les radicaux hydroxyles sont des espèces non polaires extrêmement réactives, ils peuvent rapidement extraire un atome d'hydrogène des lipides saturés formant des radicaux lipidiques (L^\bullet). Deuxièmement, les molécules d'oxygène à l'état fondamental peuvent s'ajouter au radical lipidique formant des radicaux peroxydes qui peuvent ensuite réagir avec d'autres lipides qui propageront des réactions en chaîne jusqu'à ce que des réactions de recombinaison ou de dismutation aient lieu. Étant donné que la membrane cellulaire est constituée d'une double couche de phospholipides interagissant étroitement les uns avec les autres et avec les protéines membranaires, les réactions radicalaires en chaîne

peuvent se propager à travers la membrane, causant de graves dommages qui aboutissent finalement à une nécrose par rupture de la membrane.

Une attention particulière doit être accordée aux dommages aux acides nucléiques (ADN et ARN) causés par HO^\cdot formé dans les réactions de type I. D'autre part, O_2^- réagit rarement avec les acides nucléiques en raison de l'interaction répulsive entre deux espèces chargées négativement, et bien que H_2O_2 soit neutre, il est incapable de réagir avec la plupart des biomolécules à des vitesses appréciables. L'étape initiale des réactions radicalaires dans ce contexte est le plus souvent associée à l'abstraction d'hydrogène des fragments de sucre ou à l'ajout de doubles liaisons dans les nucléotides. L'une ou l'autre voie conduira donc à la formation de radicaux au niveau des acides nucléiques. Cela pourrait à nouveau déclencher une réaction en chaîne qui amplifiera les lésions à travers la molécule d'acide nucléique elle-même ou avec d'autres molécules voisines. Par conséquent, HO^\cdot présente une capacité polyvalente à endommager l'acide nucléique ce qui peut produire plusieurs modèles de lésions pouvant par la suite altérer les processus de réplication, de transcription et de traduction (**Figure 36**) [136] [137] [138].

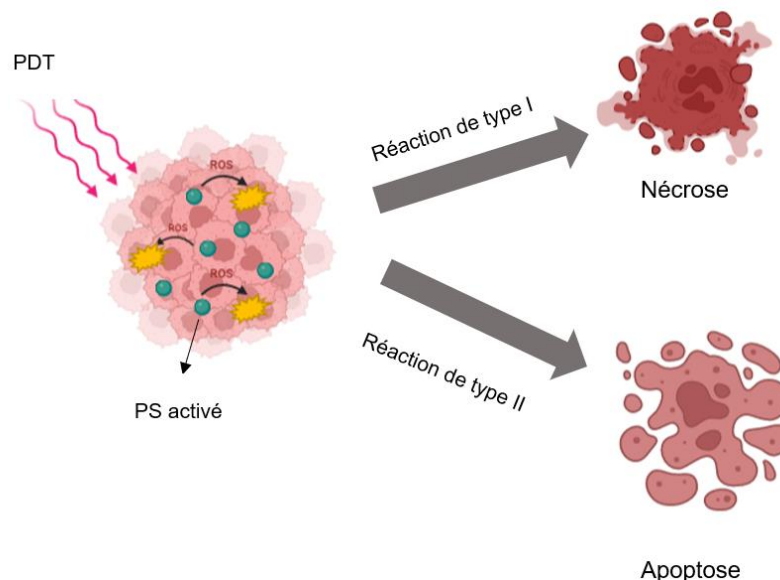


Figure 36 : Morts cellulaires induites par la PDT.
Créée par J.M via Biorender.com

III.1.2. Réactions de type II

Lorsque l'oxygène moléculaire est excité à son état singulet, la restriction de spin qui réduit les taux de réaction avec des molécules qui ne sont pas des radicaux est abolie. Par conséquent, l'oxygène singulet a une orbitale de valence vide à faible énergie qui en fait un agent oxydant assez puissant par rapport à son homologue triplet à l'état fondamental. L'oxygène singulet interagit avec les molécules via deux mécanismes de base : des interactions physiques avec des extincteurs ou des réactions chimiques avec des biomolécules et des piègeurs. Dans le premier mécanisme l'oxygène singulet transfère son énergie d'excitation à une molécule extinctrice la promouvant à son propre état excité, tandis que l'oxygène retourne à l'état fondamental. La

molécule extinctrice excitée peut être clivée pour former de nouveaux produits, ou bien elle peut réagir avec des biomolécules et causer des lésions.

L'oxygène singlet subit des réactions de cycloaddition avec des composés contenant des doubles liaisons conjuguées. Les molécules oxydées peuvent subir d'autres réactions donnant des produits finaux avec des groupes hydroperoxyde, hydroxyle et carbonyle.

Les lipides insaturés tels que le cholestérol et les acides gras essentiels peuvent également réagir avec l'oxygène singlet. Ces lipides jouent un rôle central pour maintenir l'intégrité de la membrane et sont nécessaires pour produire plusieurs cytokines et hormones. L'oxygène singlet réagit avec les doubles liaisons des lipides insaturés, formant ainsi des peroxydes lipidiques qui peuvent également déclencher des réactions radicalaires en chaîne et propager les dommages oxydatifs à travers la membrane. Notez que cet effet peut potentiellement provoquer une rupture de la membrane est beaucoup plus prononcé dans les membranes mitochondriales. Pour cette raison, les photosensibilisateurs lipophiles qui subissent préférentiellement des réactions photodynamique de type II produisent principalement de l'oxygène singlet peuvent efficacement endommager la membrane mitochondriale et conduire à l'apoptose [139] [140] [141].

III.2. Lésions cellulaires induites par la PDT

Dans le contexte de PDT, la spécificité de ciblage pour obtenir un succès thérapeutique est bien contournée récemment par la fonctionnalisations des PS avec des molécules spécifiques de ciblage, telles que des anticorps ect... , pour reconnaître des cellules spécifiques et améliorer la spécificité de la thérapie. Par contre les ERO produites à l'intérieur de la cellule endommageront toutes les molécules sensibles dans le rayon de diffusion.

D'autre part, si le stress oxydatif est trop intense ou trop prolongé, les lésions causés par les ERO peuvent être suffisantes pour induire des effets nocifs tels que l'inflammation, la mort cellulaire et les lésions tissulaires et bien évidemment cela dépend de son site de production, de son taux, de sa durée et de son rendement total. De plus, l'équilibre entre les voies de mort cellulaire apoptotiques et nécrotiques induites par les lésions des ERO dépend directement du niveau de stress oxydatif ainsi que d'autres facteurs tels que la localisation du PS (**Figure 38**).

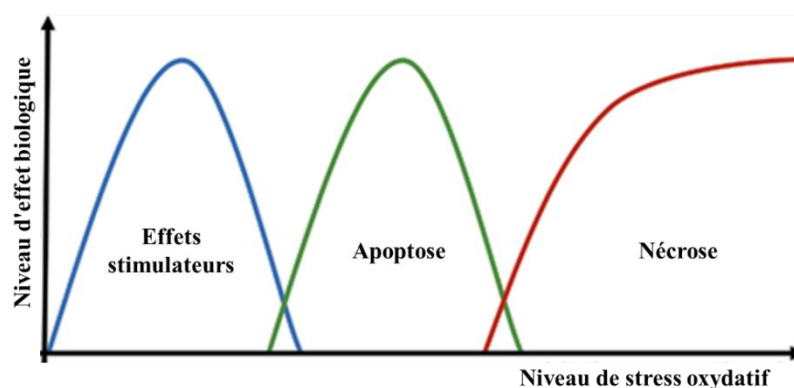


Figure 37 : Effets biologiques induits par le stress oxydatif

[72]

Par conséquent, les ERO réagissent avec les biomolécules les plus proches de leur site de production, c'est-à-dire la région d'accumulation du PS. De ce fait, la quantité de lésions distribués à chaque structure cellulaire dépend principalement de l'endroit où le PS s'accumule, de la concentration des cibles dans cette région, et de la capacité cellulaire à réparer les dommages oxydatifs [140].

III.2.1. Lésions aux niveaux des organelles cellulaires

a- Ribosomes

Les ribosomes sont de très grands complexes composés de protéines et d'ARN, responsables de la synthèse de toutes les protéines cellulaires. Les ribosomes présentent plusieurs sites labiles à l'oxydation qui peuvent conduire à leur inactivation fonctionnelle. Ce type d'endommagement de l'organite est mortel pour la cellule, puisqu'il altère la synthèse des protéines, y compris la traduction des systèmes de défense et de réparation antioxydants en réponse aux changements de l'équilibre redox cellulaire [142].

b- Mitochondries

Les mitochondries jouent un rôle essentiel dans les cascades de signalisation de l'apoptose. De nombreux PS, en particulier les amphiphiles cationiques, peuvent s'accumuler sélectivement dans les mitochondries et provoquer une perméabilisation et une destruction rapides après la photoactivation. Des niveaux élevés de peroxydes lipidiques dans la membrane mitochondriale externe peuvent ouvrir les pores de perméabilité membranaire qui permettent le passage d'activateurs de caspases tels que le cytochrome c et l'Apoptosis Inducing Factor (AIF) participant à la mort cellulaire par apoptose [143].

c- Lysosomes

Les lysosomes sont les organelles responsables de la dégradation des biomolécules intracellulaires et extracellulaires qui sont endommagées ou indésirables. L'intérieur des lysosomes est maintenu à un pH acide (pH 4,5-5) et renferme plus de 50 enzymes responsables de la dégradation de nombreux substrats biologiques. La PDT ciblée sur les lysosomes peut provoquer la rupture de la membrane, libérant ainsi tout le contenu dans le cytoplasme. Les lysosomes endommagés par la PDT libèrent également des cathepsines qui peuvent favoriser la perméabilisation de la membrane mitochondriale via le clivage d'enzymes de la famille BH3 uniquement ou peuvent même activer directement les caspases pour initier la voie intrinsèque de l'apoptose [144].

d- Réticulum endoplasmique

Le stress du réticulum endoplasmique (RE) peut entraîner plusieurs voies de signalisation différentes qui peuvent conduire à une issue favorable à la survie ou à des voies d'apoptose

intrinsèques. La voie qui décidera finalement l'avenir de la cellule est déterminée par le niveau de stress oxydatif auquel l'organite a été exposé. Des niveaux faibles à légers de ERO peuvent activer des voies de survie via l'induction de l'autophagie, et la production d'antioxydants. D'autre part, l'exposition à des niveaux élevés de stress oxydatif peut augmenter la perméabilité de la membrane du RE, entraînant la libération d'ions calcium qui provoquent une apoptose intrinsèque médiée par les mitochondries.

Le stress du RE médié par la PDT a également été associé à l'activation de la protéine CCAAT-enhancer binding proteins (C/EBPs) avec son homologue (CHOP) qui est également inducible par des lésions de l'ADN. Les transcrits de la CHOP induisent l'expression de gènes associés à l'apoptose qui définissent le destin de la cellule [145].

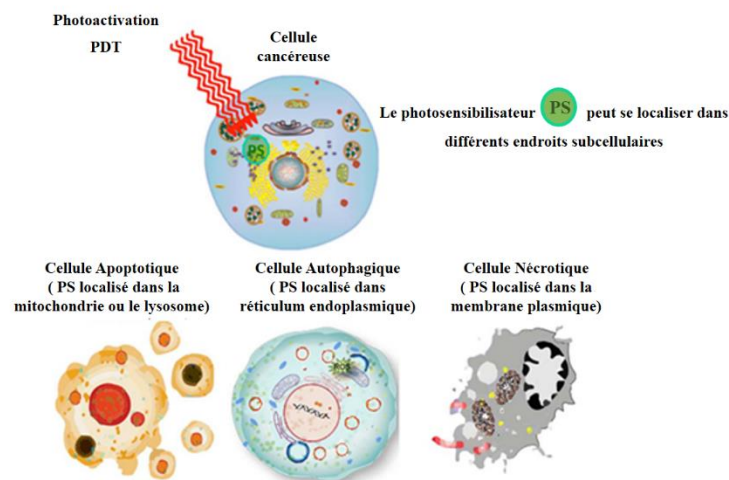


Figure 38 : Mécanismes de mort cellulaire dépendante de la localisation du PS [146]

La PDT peut causer des photo-endommagements irréversibles aux différents organites cellulaires tels que la membrane plasmique de la mitochondrie et les membranes intracellulaires, le RE, l'appareil de Golgi et les lysosomes. La localisation de la lésion dépend de l'accumulation subcellulaire du PS. Comme la plupart des PS sont localisés en dehors du noyau, les dommages à l'ADN, les mutations et la carcinogénèse surviennent de manière indirecte lors de la PDT. En général, l'apoptose est une conséquence de l'activation des PS dans les mitochondries ou dans le RE avec une induction importante de stress oxydatif, tandis que la nécrose résulte de la localisation du PS dans la membrane plasmique (**Figure 38**).

III.3. La mort cellulaire

La mort cellulaire joue un rôle important dans le maintien et la régulation de l'homéostasie chez les organismes multicellulaires. C'est également un mécanisme majeur par lequel le système immunitaire peut éliminer les cellules infectées par des agents pathogènes ou présentant des mutations potentiellement cancérigènes. Les voies qui initient et exécutent la mort cellulaire sont complexes, génétiquement codées et soumises à une régulation importante. Les mutations

dans les gènes qui régulent la mort cellulaire sont assez courantes et entraînent soit l'élimination des protéines en relation avec la suppression des tumeurs, soit l'amplification des protéines en relation avec une prolifération cellulaire incontrôlée, une étape clé dans la progression vers le cancer. La PDT vise alors à promouvoir deux voies de mort cellulaires principales qui sont la nécrose et l'apoptose comme une cible thérapeutique.

III.3.1. Nécrose

La nécrose est une forme de mort cellulaire non-programmée ou "accidentelle" dans la cellule vivante. Elle joue un rôle essentiel dans les lésions tissulaires ou organiques provoquées par diverses agressions. La perturbation de la membrane plasmique qui est caractéristique de la mort cellulaire nécrotique entraîne le déversement de protéines intracellulaires activant par la suite une réponse du système immunitaire de l'hôte. Cette vive réponse inflammatoire et cette amplification immunitaire du signal de lésion contraste fortement avec les cellules apoptotiques qui sont silencieusement éliminées par les macrophages tissulaires, ces dernières ne peuvent ni localiser, ni phagocyter " les pièces cellulaires", ce qui aboutit à l'accumulation du tissu mort et des fragments cellulaires dans l'environnement. Ainsi, la nécrose était considérée comme une forme strictement pathologique de mort cellulaire, plutôt que comme un processus physiologiquement programmé. Des preuves de plus en plus nombreuses suggèrent que, tout comme l'apoptose, des gènes spécifiques ont évolué pour réguler la mort cellulaire nécrotique (**Figure 39**) [147] [148].

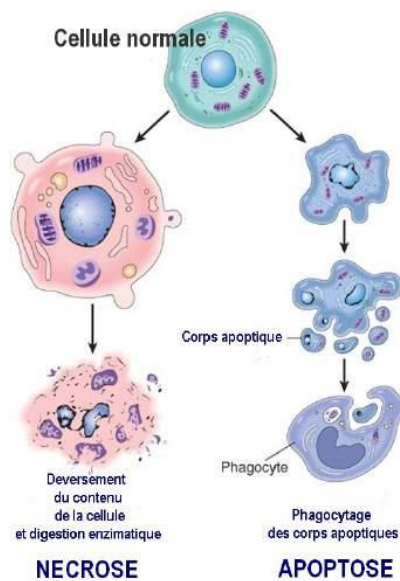


Figure 39 : Mort cellulaire par nécrose ou par apoptose [149]

III.3.2. Apoptose

L'apoptose est l'une des formes de mort cellulaire la plus étudiée et la mieux caractérisée. Connue sous le nom de mort cellulaire programmée, l'apoptose est l'emballage des cellules mourantes en fragments qui seront ensuite facilement consommées et éliminées par les phagocytes, sans perturber la fonction normale des tissus environnants. Le processus apoptotique est médié par des protéases à base de cystéine aspartate connues sous le nom de caspases, il a une apparence morphologique stéréotypée et ne suscite généralement pas de réponse immunitaire. Ce processus implique une série d'événements biochimiques conduisant à une morphologie cellulaire caractéristique et à la mort, en termes plus spécifiques, une série d'événements biochimiques qui conduisent à une variété de changements morphologiques, y compris des modifications de la membrane cellulaire telles que la perte d'asymétrie et d'attachement de la membrane, le rétrécissement cellulaire, la fragmentation nucléaire, la condensation de la chromatine et la fragmentation de l'ADN chromosomique. L'apoptose peut être initiée par deux voies distinctes : la voie intrinsèque ou mitochondriale et la voie extrinsèque ou des récepteurs de mort. Ces deux voies convergent et utilisent les caspases comme effecteurs de la mort en aval, de plus ces protéases ont des milliers de cibles et orchestrent les étapes finales de l'apoptose [147] [150].

III.3.3. Caspases et mort cellulaire

La famille des cystéine aspartate protéases (caspases) est divisée en plusieurs sous-ensembles distincts en fonction de leurs rôles spécialisés. Deux sous-ensembles, appelés caspases effectrices et initiatrices, sont des régulateurs clés de l'apoptose. Les caspases effectrices telles que les caspase(s)-3, -6 et 7 sont les médiateurs de la destruction cellulaire par la protéolyse de milliers de substrats cellulaires. Le clivage des formes monomères inactives de ces caspases les amène à former des dimères actifs et à initier des cascades de mort cellulaire.

Les caspases effectrices sont clivées par les caspases initiatrices telles que les caspase(s)-2, -8, -9 et caspase-10 chez les autres vertébrés. Contrairement aux caspases effectrices, les caspases initiatrices sont activées par des changements de conformation plutôt que par le clivage. Après l'intégration de plusieurs signaux en amont, les caspases initiatrices sont recrutées via leur long pro-domaine sur de grandes plates-formes macromoléculaires de signalisation où elles sont dimérisées et donc activées. Différents signaux et plates-formes régulent l'activation de chaque caspase initiatrice, permettant ainsi à chaque caspase d'être spécialisée pour différentes tâches cellulaires.

Le troisième sous-ensemble regroupe les caspases non-apoptotiques ou inflammatoires telles que les caspase(s)-1, -4, -5, -11 et -12. Celles-ci sont impliquées dans la réponse inflammatoire [151] [152] [153].

III.3.3.1. Structure des caspases

Les caspases sont synthétisées sous forme de précurseurs inactifs sur le plan enzymatique, tandis qu'une caspase active est un tétramère comprenant deux grandes et deux petites sous-unités [154]. Les zymogènes de la procaspase sont constitués d'un domaine C-terminal catalytique et d'un prodomaine N-terminal (**Figure 40**).

Les domaines catalytiques des caspases (où réside le site actif) sont composés d'une petite et d'une grande sous-unité, qui sont toutes les deux nécessaires pour atteindre une conformation enzymatiquement active. Le résidu de cystéine catalytique se trouve dans la grande sous-unité, tandis que la petite sous-unité contient des résidus spécifiques qui sont essentiels à la structuration des poches de liaison au substrat et qui sont donc importants pour la reconnaissance de ce substrat. Les prodomaines des caspases diffèrent en ce qui concerne leur structure et leur fonction. Les caspases effectrices apoptotiques (-3, -6 et -7) et la caspase 14 contiennent des prodomaines très courts, généralement constitués de 20 à 30 acides aminés [155].

En revanche, les caspases initiatrices et les caspases inflammatoires ont des prodomaines de grande taille (jusqu'à 220 acides aminés) qui contiennent des motifs d'interaction protéine-protéine homotypiques, tels que le domaine d'activation et de recrutement des caspases (CARD) dans les caspase(s)-1, -2, -4, -5 et -9 et les domaines effecteurs de mort (DED) dans les caspase(s)-8 et -10. Ces motifs d'interaction protéine-protéine des caspases initiatrices servent de médiateurs pour leur dimérisation et leur recrutement dans des complexes d'activation de caspases.

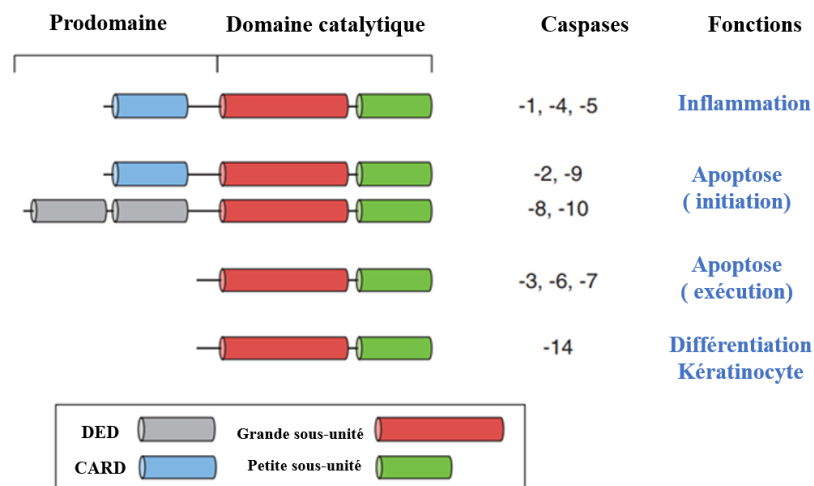


Figure 40 : Structure des domaines des caspases humaines [156]

Pour une activation des procaspases, les zymogènes doivent subir un traitement enzymatique afin d'obtenir une conformation tétramérique mature et pleinement active. Cette exigence facilite une régulation stricte de l'activité des caspases qui est essentielle pour empêcher le déclenchement inapproprié de la cascade des caspases. En fonction de la présence de motifs

d'interaction protéine-protéine dans leur prodomaine, les différentes caspases sont activées par des mécanismes biochimiques distincts.

III.3.3.2. Activation des caspases initiatrices

Les caspases initiatrices contenant un long prodomaine existent sous forme de monomères zymogènes inactifs dans les cellules non stressées. Le modèle classique d'activation des caspases initiatrices est la dimérisation induite par la proximité. Selon ce modèle, la dimérisation des caspases initiatrices se produit lorsqu'elles sont mises en proximité via le recrutement dans des complexes d'activation multimériques, ce qui entraîne des concentrations locales élevées de monomères de zymogènes. Ces conditions favorisent la dimérisation qui stimulerait l'activité catalytique et le clivage auto-protéolytique entre les petites et les grandes sous-unités du domaine catalytique. Les chercheurs pensent que l'homo-dimérisation est l'événement initial qui déclenche l'activation des caspases initiatrices qui médient ensuite la signalisation en aval vers les molécules effectrices.

Après le traitement auto-protéolytique, les prodomaines des caspases initiatrices sont également éliminés par protéolyse pour promouvoir une conformation d'enzyme mature avec une activité catalytique complète [157].

III.3.3.3. Activation des caspases effectrices

Contrairement aux procaspases initiatrices, les procaspases effectrices dépourvues de longs prodomaines existent sous forme de dimères inactifs dans les cellules non stressées et ont un mécanisme d'activation beaucoup plus caractérisé. Comme elles ne contiennent pas de motifs d'interaction protéine-protéine, les caspases effectrices dépendent du clivage protéolytique de la caspase initiatrice en amont pour leur activation. Tout comme pour les caspases initiatrices, le clivage inter-chaînes dans le domaine catalytique des caspases effectrices induit des réarrangements conformationnels dans le site actif qui augmentent considérablement leur activité catalytique (**Figure 41**) [158].

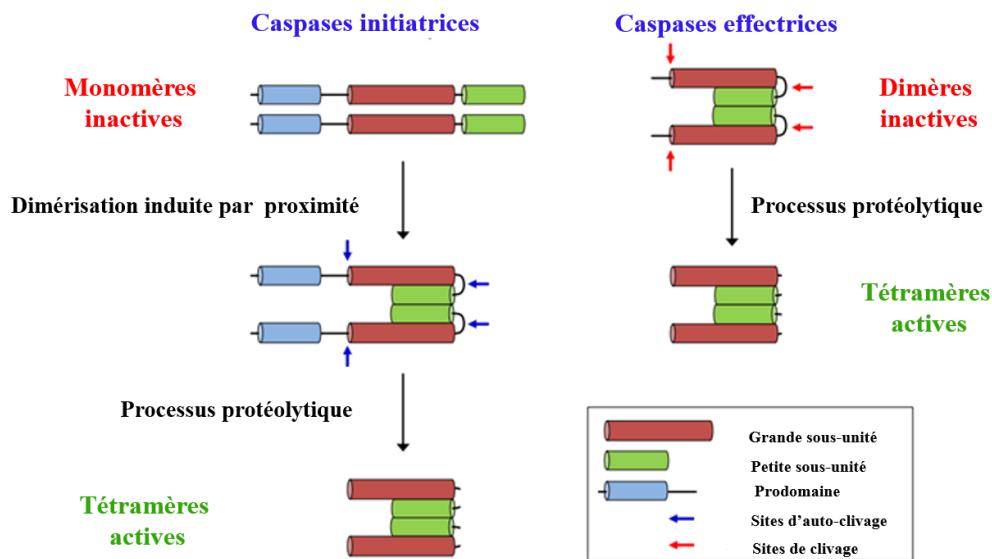


Figure 41 : Mécanismes d'activation des caspases [156]

III.4. Voies de signalisations apoptotiques

Au cours de la dernière décennie, de nombreux facteurs cellulaires impliqués dans l'apoptose ont été identifiés et leurs rôles dans la signalisation apoptotique ont été élucidés. L'apoptose est initiée lorsque les cellules reçoivent des stimuli (cytokines, UV, stress...) et passe par une voie extrinsèque (voie des récepteurs de mort) ou intrinsèque (voie mitochondriale).

III.4.1. Voie de mort cellulaire intrinsèque ou mitochondriale

La voie intrinsèque de l'apoptose est activée par une variété de signaux intracellulaires allant des lésions de l'ADN au stress oncogène. La mort cellulaire intrinsèque est le plus souvent communément associée à la perméabilisation de la membrane externe des mitochondries (MOMP) qui entraîne l'activation de la caspase-9. L'assemblage de la plateforme d'activation de la caspase-9, comprenant l'APAF1 (adaptor protein apoptotic protease activating factor 1) et le cytochrome c, est piloté par des signaux intracellulaires qui activent BAX et BAK, deux protéines de la famille BCL-2, pour former des pores dans la mitochondrie, perturbant l'intégrité de la membrane et libérant le cytochrome c. Une fois libéré de l'espace intermembranaire mitochondrial, le cytochrome c se lie à APAF1 pour favoriser la formation d'un complexe multimérique, appelé apoptosome, qui sert de médiateur à l'activation de la caspase-9. L'activation de BAX et BAK, et donc de MOMP, est régulée par l'équilibre des protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la famille BCL-2. Les protéines pro-apoptotiques "BH3-only" (par exemple, BID, BIM, PUMA et NOXA) contiennent un des quatre domaines

d'homologie BCL-2 et certaines d'entre elles peuvent activer directement les protéines BAX et BAK. Les protéines anti-apoptotiques (BCL-2, BCL-XL, A1, et MCL-1) se lient aux protéines BH-3 et leur font obstacle, et agissent directement pour inhiber BAX et BAK actifs (**Figure 42**) [159].

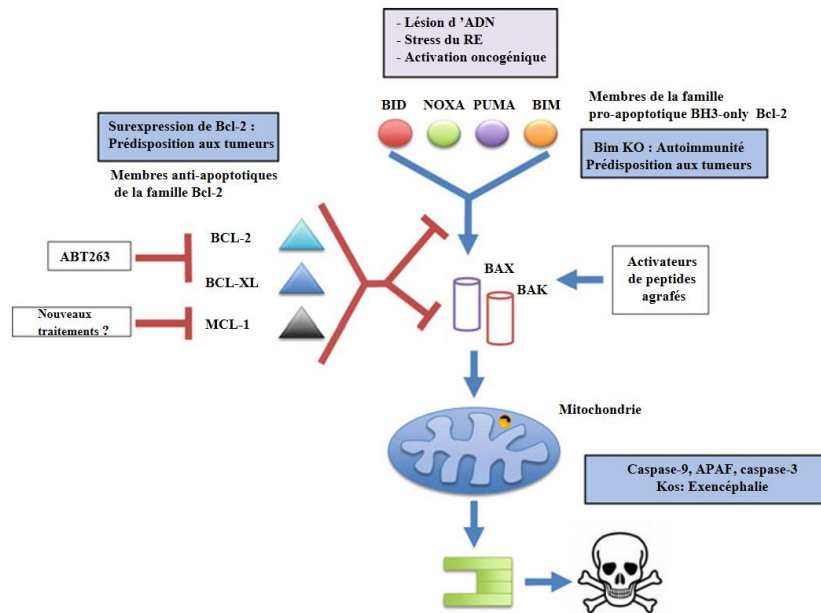


Figure 42 : Régulation complexe de l'intégrité de la membrane mitochondriale par les membres de la famille BCL-2 [160]

III.4.2. La voie extrinsèque de l'apoptose

La voie extrinsèque est engagée lorsque des ligands extracellulaires se lient à des récepteurs de mort transmembranaires. Plusieurs types de récepteurs de mort (par exemple Fas et TNFR) et de ligands (par exemple FasL et TNF α) ont été identifiés et appartiennent à la super-famille du facteur de nécrose tumorale (TNFSF). Chaque récepteur de mort possède des ligands de mort apparentés et des molécules adaptatrices spécifiques qui facilitent l'assemblage de complexes spécifiques de signalisation intracellulaire. Par conséquent, différentes combinaisons de ligands de mort et d'adaptateurs donnent lieu à une spécificité dans la signalisation des récepteurs de mort.

En effet, les signaux extracellulaires qui agissent souvent par l'intermédiaire de récepteurs de surface cellulaire appelés les récepteurs de mort de la superfamille TNFR tels que TNFR, CD95/FAS et TRAIL (récepteurs DR4 et DR5) activent la voie apoptotique extrinsèque, conduisant au recrutement et à l'activation de la caspase-8.

Lorsque ces récepteurs de mort sont engagés par leurs ligands respectifs, ils recrutent la molécule adaptatrice Fas Associated protein with Death Domain (FADD). Une fois que FADD

est combinée avec le récepteur de mort, les monomères inactifs de la caspase-8 sont recrutés et dimérisés en homodimères de caspase-8 actifs. Notons que, la plate-forme d'activation formée par la combinaison du récepteur de mort, du ou des adaptateurs et de la caspase-8 est appelée complexe de signalisation induisant la mort (DISC). Une fois activé, l'homodimère de la caspase-8 est clivé, ce qui le libère du DISC et ainsi active les caspase(s)-3 et -7 pour promouvoir l'apoptose (**Figure 43**) [162] [163].

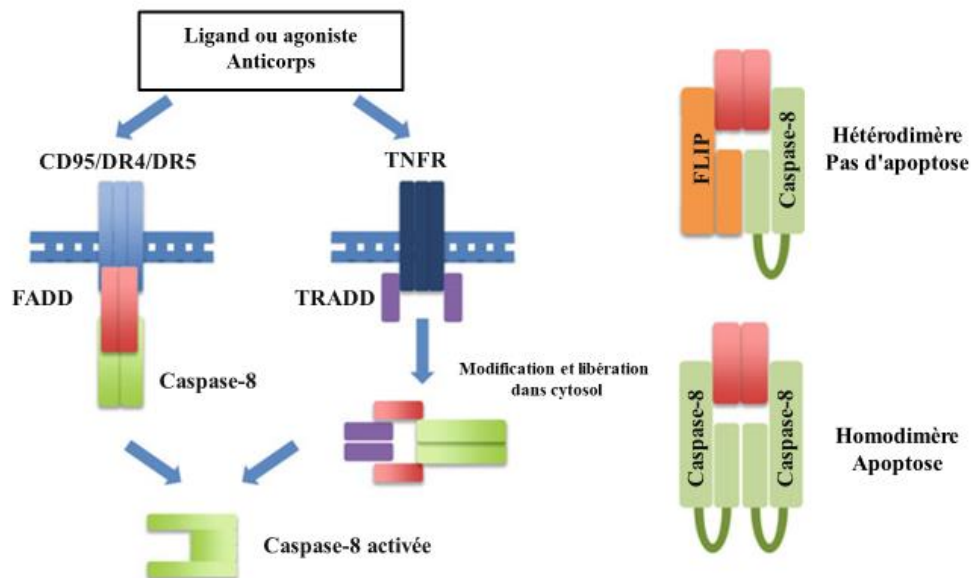
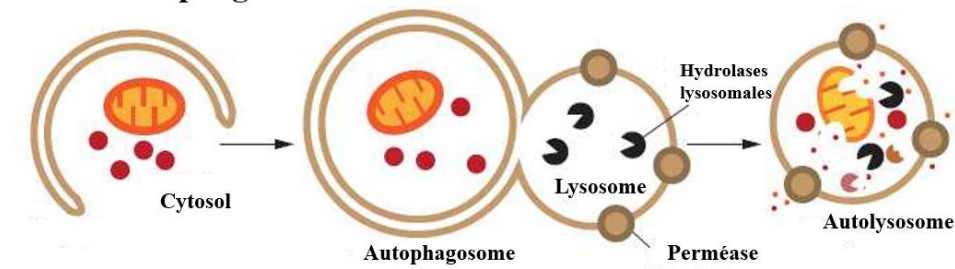


Figure 43 : La mort cellulaire extrinsèque est médiée par la caspase-8. [160]

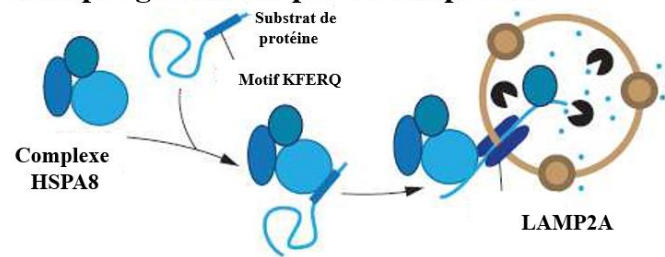
III.5. Autophagie

L'autophagie est souvent interprétée à tort comme un mécanisme indépendant de la mort cellulaire. L'autophagie est un processus catabolique qui implique la dégradation des composants d'une cellule par l'intermédiaire de la machinerie lysosomale. Il s'agit d'un processus hautement régulé qui joue un rôle normal dans la croissance, le développement et l'homéostasie des cellules en aidant à maintenir un équilibre entre la synthèse, la dégradation, et le recyclage ultérieur des produits cellulaires. Il s'agit d'un mécanisme majeur par lequel une cellule " affamée " réaffecte les nutriments des processus inutiles aux processus plus essentiels. En général, le matériel cytoplasmique, y compris les organites, est réparti dans une vésicule liée à une double membrane et est ensuite acheminée vers le compartiment lysosomal pour être dégradé. Il existe trois formes principales d'autophagie, à savoir la macro-autophagie, la micro-autophagie et l'autophagie médiée par les molécules chaperones (**Figure 44**)

Macro-autophagie



Autophagie médiée par les chaperons



Micro-autophagie

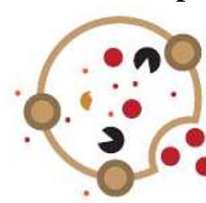


Figure 44 : Les différentes formes d'autophagie [164]

Deux fonctions principales ont été proposées pour le processus d'autophagie. Premièrement l'autophagie est une réponse au stress à court terme dans des conditions de manque de nutriments ou de carence en acides aminés. Ce terme a été inventé pour décrire la manière dont une cellule, confrontée à la famine, dégrade des composants intracellulaires afin d'obtenir les nutriments nécessaires à sa survie. Deuxièmement, il est suggéré que l'autophagie joue un rôle dans la mort cellulaire de type II. L'autophagie a été observée dans les cellules cancéreuses confrontées à une variété de stress métaboliques et thérapeutiques.

En général, plusieurs conditions ont été démontrées pour induire l'autophagie, telles que l'interruption des voies de signalisation des facteurs de croissance, l'activation de la signalisation des protéines kinases activées par des agents mitogènes, l'inhibition de la dégradation protéasomique, l'accumulation du calcium intracellulaire et le stress du réticulum endoplasmique. L'autophagie peut être initiée par des PS activés par la lumière qui s'accumulent soit dans le cytosol, le RE, les mitochondries ou les lysosomes. Après la détection d'une lésion, le signal autophagique se propage via la voie mTOR/AKT dans la cellule [165]. Il est intéressant de noter que les cellules dont la voie apoptotique est bloquée en raison d'une altération de la signalisation ou d'un manque d'ATP, peuvent également initier indépendamment l'autophagie pour promouvoir la mort cellulaire.

La production d'ERO par la PDT augmente le stress oxydatif et conduit à des dommages aux organites cellulaires. Ainsi, l'autophagie est initiée par la protéine Bécline 1 pour dégrader ces organites endommagés. Ce processus peut avoir un effet cytoprotecteur ou conduire à la mort cellulaire autophagique. Le fait que l'une de ces conséquences se produisent dépend du type des ERO et du degré de stress oxydatif [166].

III.6. PDT et voies de mort cellulaire

La PDT peut entraîner les trois formes de mort cellulaire : l'apoptose, la nécrose et l'autophagie. La réponse à la PDT peut varier non seulement en fonction du type de cellule ou de son potentiel génétique ou métabolique, mais aussi en fonction du modèle expérimental, de la puissance totale délivrée par l'irradiation, des différents types de PS et de leur localisation intracellulaire (Figure 45).

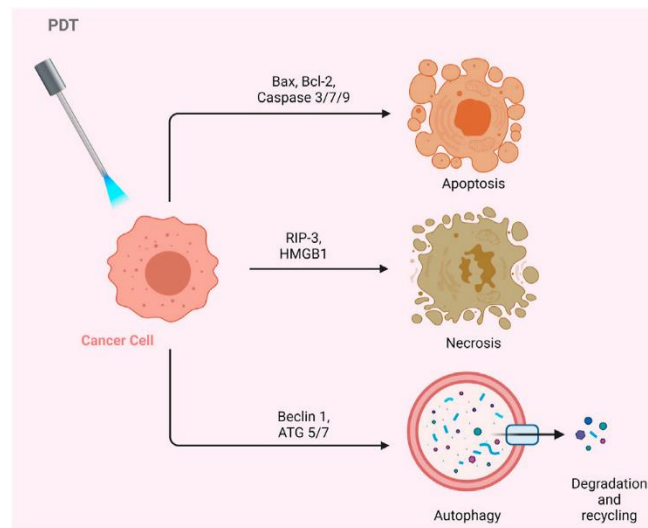


Figure 45 : Effets de la PDT sur les cellules cancéreuses. La PDT peut entraîner l'apoptose, la nécrose ou l'autophagie.

[167]

Le site initial des lésions liées à la PDT peut déterminer quelle voie de mort cellulaire est initialement activée. L'étendue des lésions liées à la PDT peut également réguler la réponse des cellules traitées. Il est possible que le processus d'autophagie soit activé comme mécanisme de sauvetage initial, lorsque les cellules endommagées par la PDT tentent de contenir et d'éliminer les protéines endommagées. Ce n'est que lorsque les lésions causées par la PDT sont suffisamment importantes et que les cellules sont endommagées au-delà de toute réparation que l'apoptose se produit. La PDT, à plus forte dose, peut également entraîner une nécrose, car les protéines qui participent à l'autophagie et à l'apoptose peuvent être immédiatement détruites et l'intégrité cellulaire peut être rompue.

En outre, la fermeture des vaisseaux tumoraux peut entraîner un appauvrissement local en nutriments et en oxygène et donc déclencher une nécrose secondaire liée à la PDT.

La compréhension de la cascade d'événements jouant un rôle important dans l'apoptose médiée par la PDT est loin d'être complète. La définition de ces événements permettra alors de concevoir les meilleurs protocoles de PDT, qui pourraient avoir des applications plus larges en tant que modalité thérapeutique anti-cancéreuse [168].

Chapitre IV. Ruthénium et applications anticancéreuses

IV.1. PS à base de métaux

La PDT est une modalité anticancéreuse qui se développe activement et qui offre des avantages par rapport aux traitements conventionnels. L'intérêt de la PDT réside dans l'utilisation de doses non thermiques et non dangereuses de lumière et de concentrations non toxiques de PS qui engendrent des effets cytotoxiques après photoactivation par une longueur d'onde convenable à sa bande d'absorbance. La PDT est censée détruire sélectivement les cellules indésirables et/ou malignes tout en préservant largement les tissus sains environnants. La PDT a été approuvée il y a près de 20 ans comme un traitement anticancéreux. Néanmoins, malgré ses avantages potentiels, elle est encore sous-exploitée sur le plan clinique, et seul un petit nombre de PS de type porphyrine et chlorine ainsi que les PS à base de bactériochlorophylle sont approuvés. La recherche vise constamment à trouver les meilleurs PS pour améliorer l'efficacité de la PDT. C'est ainsi qu'est apparu le développement des PS à base de métaux notamment les PS à base de Platine (Pt(II)) comme la cisplatine et l'oxaliplatine et bien d'autres... en s'appuyant sur la théorie de la réactivité et de l'interaction entre les complexes de métaux et les biomolécules telles que l'ADN et les protéines ce qui a permis une avancée significative sur la compréhension des processus biochimiques et le développement des médicaments thérapeutiques (**Figure 46**) [169].

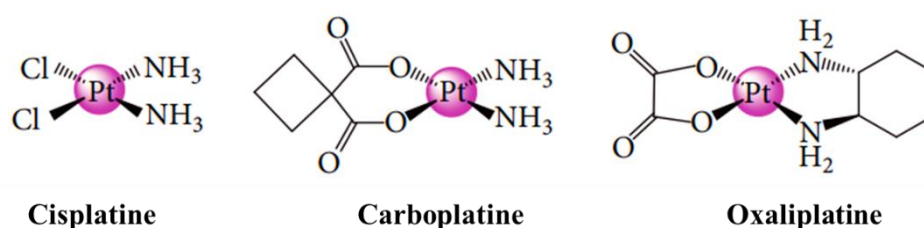


Figure 46 : Molécules anticancéreuses à base de platine : cisplatine, carboplatine et oxaliplatine [170]

Le cisplatine (*cis*-diamminedichloridoplatine(II)), dont l'utilisation clinique a été autorisée en 1978, est l'un des complexes les plus utilisés dans les thérapies anticancéreuses avec les médicaments de deuxième génération tels que le carboplatine (*cis*-diammine(1,1-cyclobutanedicarboxylato) platine(II)) ou l'oxaliplatine (*Trans-R, R*-cyclohexane- (1,2-diamine) oxaliplatine(II)).

En effet, les médicaments de Pt(II) sont activés par hydrolyse lente des ligands anioniques, les complexes aqueux cationiques correspondants ainsi formés agissent en se liant à l'ADN,

formant des liaisons transversales stables qui bloquent ensuite la réplication et/ou empêchent sa transcription. Indépendamment des résultats obtenus par les médicaments actuels à base de Pt, ceux-ci présentent des inconvénients majeurs : ils ne sont efficaces que pour un nombre limité de cancers. En effet certaines tumeurs peuvent présenter une résistance acquise ou intrinsèque, et ces médicaments provoquent souvent de graves effets secondaires, tels que des nausées, des effets nocifs sur la moelle osseuse et une toxicité rénale. La recherche pour de nouveaux agents anticancéreux à base d'autre métal a donc été une nécessité. Les complexes de métaux de transition autres que le Pt peuvent, en principe, présenter une activité anticancéreuse et des effets secondaires toxiques très différents pour un certain nombre de raisons évidentes : on s'attend à ce qu'ils aient un comportement chimique, des vitesses d'hydrolyse et un mécanisme d'action différents [171] [172].

IV.2. Ruthénium pour la thérapie anticancéreuse

Les complexes de métaux de transition composés de ligands organiques liés au métal central ont joué un rôle important en termes d'applications liées à la civilisation humaine. Positionné au centre de la deuxième rangée de la série des métaux de transition, le Ruthénium (Ru) présente des propriétés des métaux de transitions très distinctes. En raison de sa nature acide de Lewis mais moins oxophile, cet élément présente un éventail de propriétés utilisées dans de nombreux domaines industriels et scientifiques. Le Ru a également été étudié dans le domaine de la chimie inorganique médicinale qui a connu une croissance constante au cours des dernières décennies. Le complexe de Ru le plus étudié ces dernières années est le $[\text{Ru}(\text{2,2-bipyridine})_3]^{2+}$, parfois appelé rubipy, et ses dérivés. Sous l'effet d'une irradiation à la lumière visible en PDT, le rubipy produit un état triplet photoexcité à longue durée de vie, consistant essentiellement en $[\text{Ru}(\text{III})(\text{2,2-bipyridine})_2(\text{2,2-bipyridine}^-)]^{2+}$. Il a été souligné au milieu des années 70 qu'en principe cet état photoexcité est capable à la fois d'oxyder et de réduire l'eau en O_2 et H_2 respectivement, donnant lieu à un champ de recherche plus large (**Figure 47**) [173] [174].

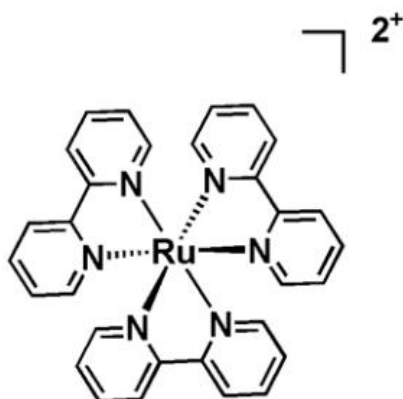


Figure 47 : Structure moléculaire du $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$. [175]

Depuis la découverte du Ru, sa chimie continue de fournir de nouvelles découvertes fascinantes et de technologies potentielles. Au cours des dernières années, le domaine de la chimie de coordination et de la chimie organométallique du Ru s'est développé, il a évolué à un rythme sans précédent et a fait l'objet de nombreuses recherches. Les études récentes mettent en évidence des avancées majeures dans les complexes du Ru et dans leurs applications chimiquement abordables et dans des domaines difficiles tels que la biologie, la médecine, la catalyse, les nanosciences, l'oxydoréduction et les matériaux photoactifs. Cette expansion exceptionnelle est principalement due à la capacité unique du noyau de Ru à permettre plusieurs états d'oxydation, d'où des voies de transfert d'électrons [176].

Le Ru offre une large gamme d'état d'oxydation qui sont accessibles chimiquement et électrochimiquement. Par conséquent, les complexes de Ru sont redox-actifs et leur application en tant que réactifs redox dans différentes réactions chimiques est l'intérêt actuel. La stabilité cinétique du Ru a plusieurs états d'oxydation différents. La nature souvent réversible de ses couples redox et la facilité relative avec laquelle les complexes à ligands mixtes peuvent être par des méthodes progressives contrôlables font des complexes de Ru des cibles d'étude particulièrement attrayantes.

Les complexes de Ru avec des ligands polypyridyles ont reçu beaucoup d'attention en raison de leurs intéressantes propriétés spectroscopiques, photophysiques, photochimiques et électrochimiques. Ces propriétés conduisent à leur utilisation potentielle dans divers domaines tels que les PS pour la conversion photochimique de l'énergie solaire et les dispositifs électroniques moléculaires et comme agents photoactifs de clivage de l'ADN à des fins thérapeutiques [177] [178] [179].

IV.3. Activité antitumorale du Ru et ses dérivés

Les complexes de Ru sont également connus pour effectuer une variété de transformations inorganiques et organiques. Leur polyvalence de synthèse, leurs performances catalytiques élevées dans des conditions de réaction relativement douces et leur grande sélectivité les rendent particulièrement bien adaptés à cet effet. Une large gamme d'agents à base de Ru a été synthétisée et testée pour ses propriétés antitumorales au cours des 30 dernières années. La plupart de ces agents, indépendamment des ligands attachés à l'ion Ru, ont montré une cytotoxicité relativement faible et sont moins toxiques que le cisplatine, nécessitant par conséquent une dose thérapeutique plus élevée. Malgré leur faible potentiel cytotoxique, de nombreux complexes de Ru augmentent l'espérance de vie des patients porteurs de tumeurs. Les complexes de Ru (III) restent très probablement dans leur état d'oxydation Ru (III) (relativement inactif et non réactif) jusqu'à ce qu'ils atteignent le foyer tumoral. Dans cet environnement, avec sa teneur en oxygène et son pH plus faibles que dans le tissu sain, la réduction à l'état d'oxydation plus réactif du Ru (II) peut avoir lieu. De cette manière appelée "activation par réduction", les composés de Ru (III) peuvent avoir une toxicité sélective (**Figure 48**).

Un deuxième mécanisme qui permettrait d'expliquer l'activité antitumorale observée pourrait être la grande affinité du Ru (III) pour les sites de liaison au fer de la transferrine. Cette capacité de liaison offre la possibilité de cibler les complexes de Ru (III) sur les tumeurs présentant une forte densité de récepteurs de transfert. Un grand nombre de complexes de Ru (dans les états d'oxydation II et III) ont été synthétisés et ont montré une activité antitumorale *in vitro* [180] [181].

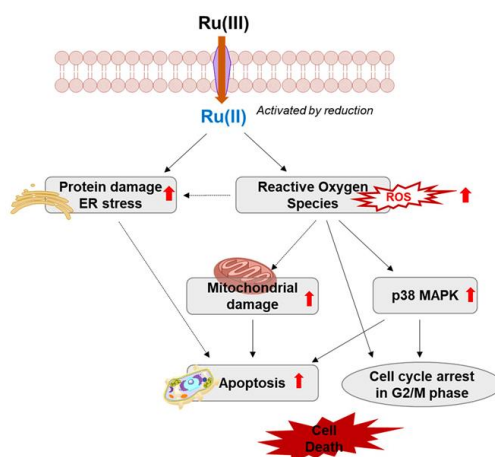


Figure 48 : Les mécanismes anticancéreux des complexes de Ru [182]

IV.4. Potentialité des composés du Ru comme médicaments perspective

Au cours des 25 dernières années, les composés du Ru, classiques ou organométalliques, ont été largement explorés en ce qui concerne leurs utilisations potentielles en médecine. En particulier, ils ont suscité un intérêt considérable en tant que base de nouveaux composés pour traiter le cancer. En effet, l'intérêt pour les médicaments à base de Ru a abouti à la découverte de deux complexes, NAMI-A (imidazolium trans-diméthylsulfoxide-imidazole-tétrachlororuthénate) et KP 1019 (imidazolium trans-bis(1H-indazole) possédant des propriétés anticancéreuses très intéressantes et encourageantes (Figure 49).

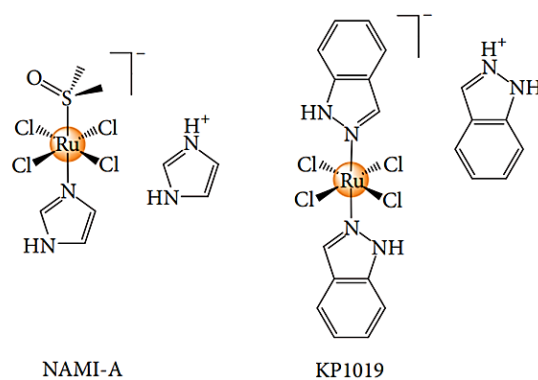


Figure 49 : Composés cytotoxiques de Ru NAMI-A et KP 1019 [183]

Bien que ces deux complexes présentent des ressemblances structurelles, leurs modes d'action antitumoraux sont différents. Le NAMI-A présente une activité inhibitrice sur la formation de métastases et anticipe la dissémination des cellules cancéreuses en affectant l'angiogenèse, notamment dans le cas du cancer du poumon. Le KP 1019, quant à lui, a une action cytotoxique : il attaque et détériore les cellules cancéreuses et plus particulièrement les cellules tumorales colorectales résistantes au cisplatine en déclenchant leur apoptose [184] [185] [186].

IV.5. PS conjugué au Ru pour la PDT

La sélectivité de la PDT en tant que traitement anticancéreux repose sur la génération locale d'ERO cytotoxiques dans le tissu tumoral, due à la fois à l'absorption préférentielle du PS par le tissu malin et à l'irradiation lumineuse localisée qui s'ensuit. En effet le PS, aux concentrations utilisées pour la PDT, n'est pas toxique à l'obscurité et ne devient photocytotoxique que lorsqu'il est exposé à la lumière selon sa longueur d'onde appropriée [187]. Pour améliorer la sélectivité des cellules tumorales, le PS peut être couplé à une partie ciblant les tumeurs, comme un peptide [188], un acide folique [189], un sucre [190] etc...

Le couplage d'un vecteur peut soit (i) moduler l'amphiphilicité et/ou améliorer la solubilité de ces composés dans les milieux biologiques et empêcher l'auto-agrégation (ciblage passif), soit (ii) favoriser la reconnaissance cellulaire, avec l'utilisation d'un vecteur (ciblage actif), dans le but d'augmenter l'efficacité thérapeutique.

Plusieurs de ces stratégies de ciblage offrent l'avantage de transporter la molécule photosensibilisatrice à travers la membrane cellulaire, ce qui entraîne une accumulation intracellulaire du composé photoactivable et permettra de cibler des sites intracellulaires photosensibles, et donc d'améliorer l'efficacité photodynamique.

Divers PS coordonnés à des complexes de Ru ont été conçus et testés *in vitro* [191]. Ces complexes visent en effet à (i) combiner la cytotoxicité du Ru avec l'activité photodynamique des PS, (ii) améliorer la sélectivité tumorale et l'absorption cellulaire des PS grâce au transport spécifique du Ru vers les cellules tumorales par la transferrine, (iii) augmenter l'hydrophilie des PS selon les ligands du Ru, (iv) combiner l'activité du PS et le photoclivage de l'ADN induit par le Ru par irradiation de la tumeur.

La porphyrine et ses dérivés conjugués au ruthénium sont très étudiés en tant que PS. En effet, la conjugaison des porphyrines à des fragments métalliques périphériques est une stratégie intéressante pour la fabrication de composés qui pourraient combiner la cytotoxicité de la fraction métallique à la phototoxicité du chromophore de la porphyrine pour des effets antitumoraux additifs [187].

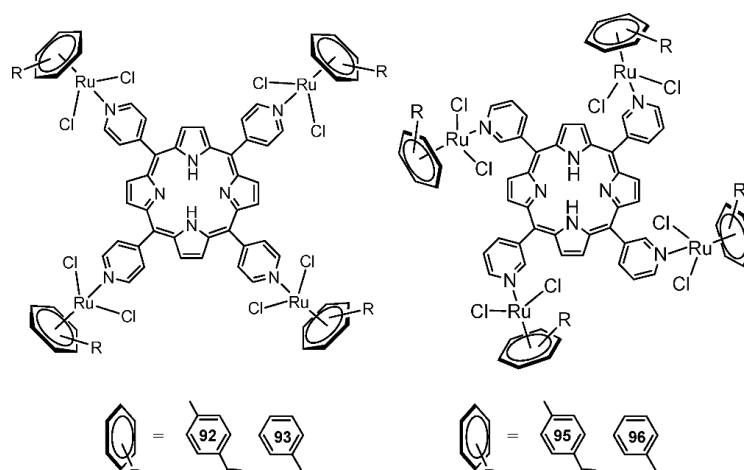


Figure 50 : Complexes arène-Ru tétranucléaires conjugués à la porphyrine pour la PDT [192]

Des études ont montré qu'en plus de l'activité conventionnelle de la PDT, les conjugués métal-porphyrine pourraient présenter d'autres caractéristiques positives telles que la sélectivité tumorale. En effet, les porphyrines montrent généralement une absorption et une rétention préférentielles par les tissus tumoraux, probablement par le processus d'endocytose médié par les récepteurs des lipoprotéines de basse densité [193].

Des études menées par nos collaborateurs suisses ont rapporté que les conjugués neutres de méso-pyridylporphyrines avec des fragments organométalliques $Ru(\eta^6\text{-arène})Cl_2$ présentent un effet cytotoxique sur les cellules de mélanome humain Me300 après photoactivation par la lumière visible [194]. Des résultats similaires ont également été rapportés par *Swavey et al.* pour des conjugués cationiques portant de 1 à 4 fragments $[Ru(bpy)_2Cl]^{2+}$ [195].

En outre, *Gianferrara et al.* ont décrit la préparation et la caractérisation de plusieurs nouveaux conjugués Ru-porphyrine qui portent soit des fragments Ru(III) soit des composés de coordination Ru(II), ainsi que de composés de Ru-TedabpyPP tétracationique, solubles dans l'eau qui ont montré des effets phototoxiques et une inhibition *in vitro* de la prolifération cellulaire des cellules MDA-MB-231 de cancer du sein après irradiation avec de la lumière visible (590-700 nm) [196].

IV.6. Complexes d'arène-Ru aux propriétés antitumorales

Comme nous le voyons dans les études ci-dessus, la recherche d'agents anticancéreux alternatifs à base de métal est une nécessité, les composés de Ru se sont avérés être les candidats les plus prometteurs. Un certain nombre d'agents anticancéreux à base de Ru ont été développés à ce jour, mais aucun d'entre eux n'est utilisé en clinique. Même si le NAMI-A et le KP1019 sont entrés en essais cliniques démontrant des activités prometteuses, de nombreuses études s'intéressent à la chimiothérapie à base de Ru pour de nouveaux médicaments anticancéreux [197] [198]. Les composés organométalliques sont généralement considérés comme instables, et se décomposent lorsqu'ils sont exposés à l'air et à l'eau même s'il existe un nombre croissant de ces complexes organométalliques qui présentent une stabilité et une

solubilité aqueuse. En effet, le terme " chimie bioorganométallique " a été introduit en 1985 par Jaouen qui a stimulé l'intérêt de la chimie organométallique pour la recherche de médicaments anticancéreux [199].

Le domaine des complexes arène-Ru antitumoraux et antimétastatiques a été inauguré par Dyson et Sadler, après que l'idée d'utiliser des composés arène-Ru comme agents anticancéreux avait été introduite pour la première fois par Tocher et al. en 1992. Cette première étude a montré une augmentation de la cytotoxicité en coordonnant l'agent anticancéreux métronidazole [1-b-(hydroxyéthyl)-2-méthyl-5-nitro-imidazole] à un fragment dichlorobenzène de Ru [200] [201] .

IV.7. Les assemblages métalliques comme système de vectorisation

Dans le but de contourner le problème de solubilité et de stabilité des PS à base de Ru, les assemblages métalliques ont commencé à attirer une attention considérable, mais ces systèmes sont restés relativement peu explorés en tant que vecteurs d'encapsulation des médicaments. L'assemblage de complexes de métaux de transition avec des ligands polydentés pour obtenir des structures supramoléculaires discrètes a été étudié par plusieurs groupes. La combinaison de blocs de coordination de 90° et de ligands linéaires pour former des assemblages carrés (quatre centres métalliques pontés par quatre ligands bidentés équivalents) et rectangulaires (quatre centres métalliques pontés par des ligands de différentes longueurs) a été largement explorée [202] [203] (**Figure 51**).

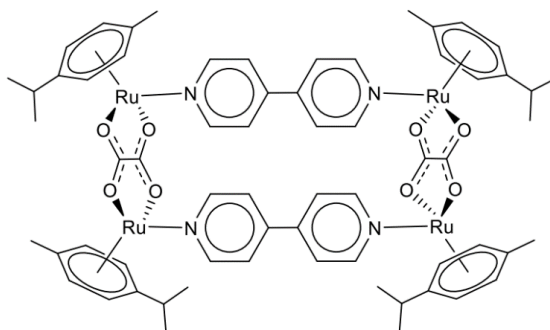


Figure 51 : Structures moléculaires des assemblages métalliques [204]

Quelques années plus tard, la même approche a été utilisée afin de créer des assemblages tridimensionnels discrets. Jusqu'à présent, une multitude de structures bidimensionnelles et tridimensionnelles incorporant des métaux de transition à géométrie plane carrée ont été synthétisées. Ces assemblages moléculaires ont été utilisés pour générer des environnements d'isolation pour les PS afin d'encapsuler et de protéger les molécules invitées, sensibles ou instables. Ces assemblages ont été connus par système de "hôte-invité" [172] [204].

IV.8. Cages métalliques à base d'arène-Ru

De nombreux assemblages de métaux ont joué un rôle essentiel en tant que systèmes d'hôtes, cependant l'arène-Ru a reçu une attention toute particulière en raison de ses caractéristiques intéressantes. Tout d'abord, le composé de départ, le dimère d'arène-Ru $[\text{Ru}(\eta^6\text{-arène})(\mu^2\text{-Cl})\text{Cl}]_2$ est facile à synthétiser. Ensuite, les complexes d'arène-Ru sont stables et ne nécessitent pas de précautions notables pour le stockage. De plus, ils sont généralement bien solubles dans les solvants organiques classiques en donnant un grand intérêt pour les applications biologiques.

Nos collaborateurs suisses ont signalé par plusieurs études que la mauvaise solubilité de certains PS pouvait être résolue en utilisant des cages métalliques à base d'arène-Ru comme transporteurs de deux manières différentes [205] [206] :

- le premier type de cages améliore la solubilité de ces complexes organométalliques dans les milieux biologiques, de même ces cages peuvent accueillir les PS en tant qu'invités dans leurs cavités internes, en les transportant et en les libérant dans les cellules cibles (**Figure 52A**),
- le deuxième type de cages est plus spécifique reposant sur l'introduction ou l'intégration du PS dans la structure initiale de la cage métallique ce qui maintient une excellente solubilité physiologique et garde le PS disponible pour être irradié à tout moment (**Figure 52B**).

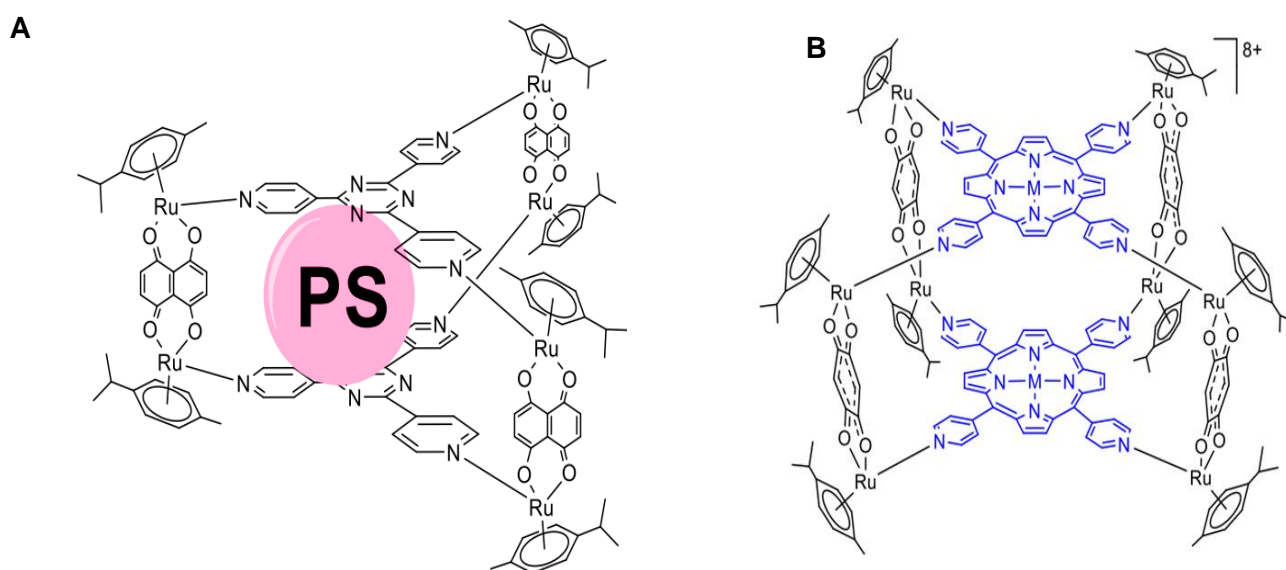


Figure 52 : Structures de cage métallique de Ru(II)

Les cages métalliques sont construites à partir de deux blocs principaux :

- Le complexe bimétallique arène-Ru (clip), qui peut être considéré comme les bords de la cage. Un ligand espaceur tétradenté sépare les deux atomes de Ru et établit la distance entre eux et donc définit la taille de la cage,
- Le ligand panel forme la cage métallique. Des ligands triangulaires ou carrés ont été utilisés ce qui a donné lieu à des cages métalliques prismatiques ou cubiques, respectivement.

Il faut bien noter que la structure des cages métalliques prismatiques contient une cavité interne à caractère hydrophobe. De ce fait, lorsqu'un composé planaire à caractère hydrophobe est ajouté au mélange réactionnel avec le ligand panel, cet invité (pour autant que sa structure et sa taille le permettent) se retrouve par affinité dans la cavité. C'est la stratégie utilisée pour intégrer des PS peu solubles dans l'eau dans les cages métalliques afin de les transporter dans des milieux biologiques (**Figure 53**) [207].

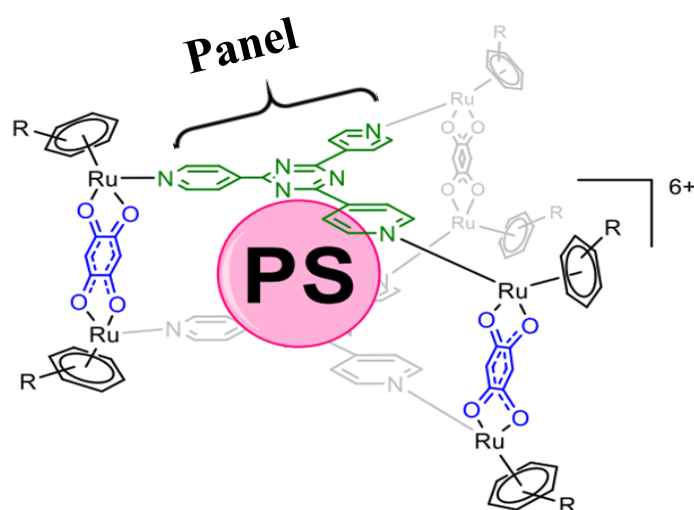


Figure 53 : Structure prismatique de cage métallique de Ru(II) [207]

Alors que pour le deuxième type de cages métalliques, ces dernières sont construites de sorte que le PS fait partie intégrante de la structure de la cage, et est utilisé comme un ligand panel. Le PS contenant des substituants pyridine peut être coordonné aux atomes de Ru de la même manière que les panels triangulaires (**Figure 54**).

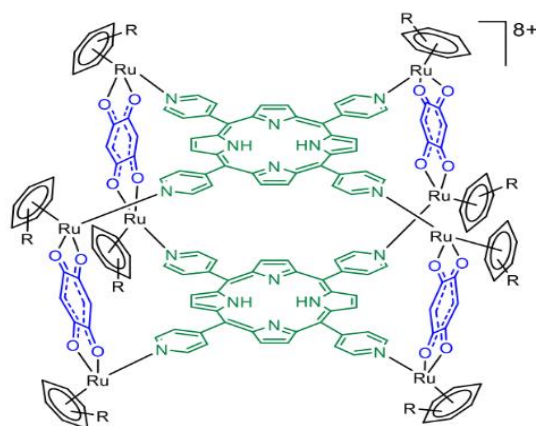


Figure 54 : Structure cubique de cage métallique de Ru(II) [207]

Cette nouvelle stratégie d'encapsulation mise en place permettant au PS de ne pas être un invité dans la cavité interne de la cage mais de faire partie de sa propre structure a apporté un grand avantage pour améliorer l'efficacité de la PDT. En effet, une fois la cage intégrée dans la cellule, ce n'est plus nécessaire de libérer le PS pour assurer son activité. Par cette méthode, le PS est toujours disponible pour toute irradiation. De plus, puisque ces systèmes de vectorisation contiennent deux unités de PS comme ligands par cage métallique cubique, leurs concentrations de traitement peuvent être réduites ce qui veut dire réduire la dose nécessaire pour une même activité et efficacité de PDT par rapport à d'autres traitements [208] [209] [210].

Plusieurs dérivés de porphyrine ont déjà été évalués en PDT pour traiter diverses maladies avec de nombreuses conclusions encourageantes. De ce fait nos collaborateurs chimistes ont décidé d'utiliser la tétrapyridylporphyrine (TPyP) comme PS parce qu'elle peut être coordonnée directement aux complexes dinucléaires arène-Ru(II) tels que $[\text{Ru}_2(\eta^6\text{-p-}i\text{PrC}_6\text{H}_4\text{Me})_2\text{Cl}_2(\mu\text{-C}_6\text{H}_2\text{O}_4\text{-}\kappa\text{O})]$ et $[\text{Ru}_2(\eta^6\text{-}i\text{PrC}_6\text{H}_4\text{Me})_2\text{Cl}_2(\mu\text{-C}_2\text{O}_4\text{-}\kappa\text{O})]$, via une liaison Ru-NPy, donnant lieu à des cages cubiques avec des panels de porphyrine [211] [212].

La spécificité de la PDT en tant que thérapie anticancéreuse repose essentiellement sur la génération locale d'ERO cytotoxiques dans le tissu tumoral induisant la mort cellulaire de ce dernier. En effet, la croissance accélérée des cellules cancéreuses entraîne généralement une diminution des concentrations d'O₂ dans le tissu cible ce qui produit la possibilité d'une production moins efficace des ERO [213] [214].

Pour résoudre ce problème, certains groupes de recherche ont proposé d'oxygéner le tissu tumoral par oxygénothérapie hyperbare (HBO₂) avant la PDT. Avec cette stratégie d'encapsulation, le PS utilisé est à base du TPyP liée à des complexes arène-Ru(II) afin d'améliorer la faible solubilité de ce tétrapyrrole dans les milieux biologiques (**Figure 55**) [215].

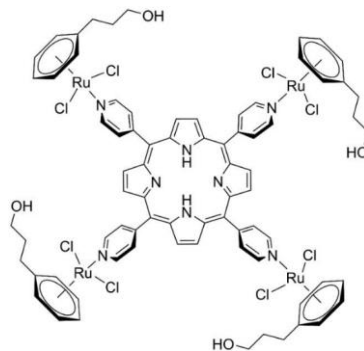


Figure 55 : Structure d'un complexe tétrapyridylporphyrine fonctionnalisé avec arène-Ru. [215]

De plus, certains de ces complexes de Ru contiennent des substituants dans les ligands arènes tels que des groupes hydroxydes qui pourraient potentiellement contribuer à la présence d'espèces oxygène, ce qui peut donner lieu à plus d' $^1\text{O}_2$ et augmenter la production d'ERO [215].

Suite à la synthèse de ces assemblages métalliques exclusifs par nos collaborateurs suisses, *Gallardo-Villagrán* a été le premier à tester durant sa Thèse ce type de molécules vectorisées sur un modèle *in vitro* de polyarthrite rhumatoïde. En effet, son étude a montré les effets cytotoxiques de plusieurs types de cages métalliques de formes prismatiques et cubiques à base d'arène-Ru pour la fonctionnalisation de différents types de PS pour la PDT. Les résultats obtenus ont été très encourageants avec des IC_{50} de l'ordre du nanomolaire sans cytotoxicité à l'obscurité [216].

Dans ce projet, nous nous sommes intéressés au deuxième type d'encapsulation lorsque la cage métallique est de forme cubique portant dans sa propre structure deux unités de PS à base du TPyP de formule chimique (5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)-21*H*,23*H*-porphine) en tant que panel. Cet intérêt repose sur les propriétés exceptionnelles de cet assemblage métallique. En effet, cette structure d'encapsulation offre à notre traitement divers avantages :

- a- Combinaison de l'effet cytotoxique de la porphine avec celui du Ru ce qui augmente l'effet de la PDT,
- b- La TPyP a une mauvaise solubilité dans les milieux biologiques à cause de sa structure planaire, une telle encapsulation assure par conséquent son internalisation cellulaire,
- c- Cet assemblage métallique de forme cubique renferme des substituants de ligands tels que les groupes hydroxydes qui pourraient potentiellement favoriser la génération des ERO,
- d- Vue sa structure distincte, la présence de deux unités de PS renforce l'efficacité du traitement, et par conséquent permet de réduire la dose nécessaire pour obtenir un meilleur effet thérapeutique,
- e- La cage métallique porte le PS dans sa propre structure, de ce fait une fois la cage internalisée dans la cellule, le PS est disponible à l'irradiation à tout moment ce qui dispense de la nécessité de sa libération pour assurer son activité.
- f- La cage ne présente aucun effet cytotoxique à l'obscurité.

g- L'assemblage à base de Ru une fois formé présente une stabilité dans son environnement.

Toutes ces caractéristiques rendent notre système un des meilleurs systèmes d'encapsulation des PS pour améliorer l'efficacité de la PDT.

Par ailleurs, afin d'évaluer l'influence de la présence des métaux dans cet assemblage sur la photoactivité du PS, nos collaborateurs chimistes se sont basés sur l'idée d'introduire le métal diamagnétique (Zn^{2+}) au centre de l'anneau de tétrapyrrole dans les TPyP de telle manière à pouvoir vérifier si la photoactivité du PS était modifiée ou non en présence de ce métal (**Figures 56 et 57**) [207] [217]

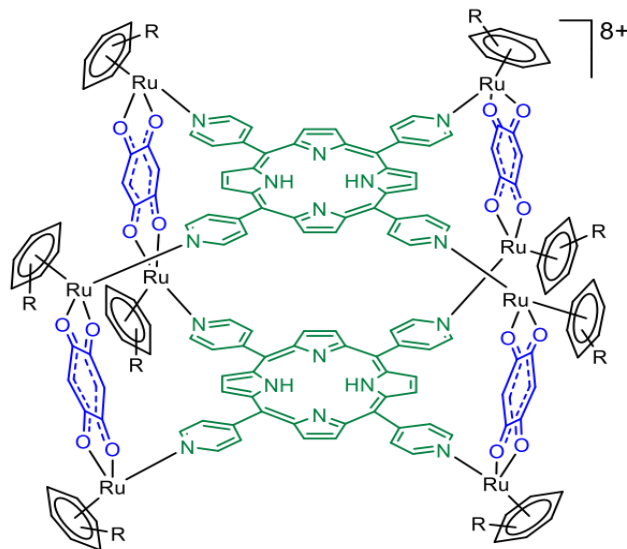


Figure 56 : Cage métallique de Ru contenant du TPyP

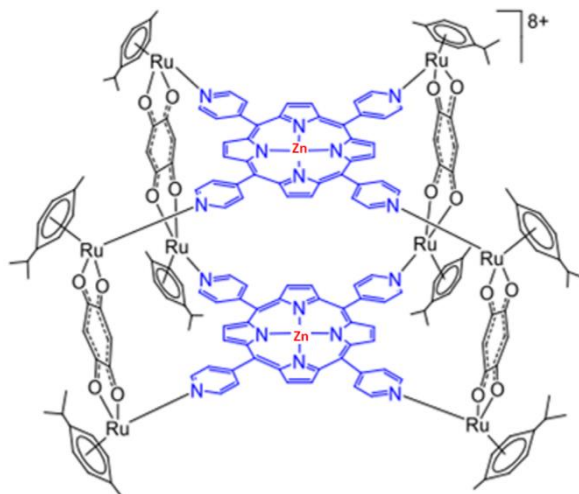


Figure 57 : Cage métallique de Ru contenant du Zn-TPyP

Projet de recherche

Le CCR, comme toutes les autres tumeurs malignes, reste un défi pour les patients et les médecins. Sur le plan épidémiologique, en 2022 le CCR est le troisième cancer le plus fréquent et la deuxième cause de décès par cancer. Son traitement conventionnel repose sur la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie ou la thérapie ciblée. Malgré le développement continu de la recherche clinique, un tiers des patients au moment du diagnostic présentent des métastases et chez tous les autres, même avec un traitement radical, le cancer récidive. La résistance significative aux traitements conventionnels, le caractère invasif élevé et le potentiel métastatique avec une forte probabilité de récurrence suggèrent la nécessité d'utiliser des méthodes innovantes qui, en ciblant les cellules cancéreuses de manière la plus sélective possible, augmenteront les chances de leur destruction, tout en préservant les tissus sains environnants. Récemment, la PDT utilisant des PS à base de porphyrine ou des dérivés chlorés fait l'objet d'une attention croissante dans le traitement du CCR. Le mécanisme moléculaire de la PDT implique une interaction simultanée entre un PS, une source lumineuse d'une longueur d'onde appropriée et de l'oxygène moléculaire. Pendant la PDT, le PS absorbe la lumière visible et convertit son énergie pour générer une série d'espèces d'oxygène hautement réactives. Actuellement, les PS les plus largement utilisés en PDT sont les dérivés du tétrapyrrole tels que les porphyrines, les chlorines, les bactériochlorines et les phthalocyanines. Néanmoins, les principaux inconvénients de ces PS sont leur faible solubilité qui limite leur administration intraveineuse, leurs mauvaises propriétés photophysiques dues à leurs agrégations et leur faible sélectivité tumorale limitant par conséquent leur utilisation dans les essais cliniques. Constamment, l'objectif le plus important de la recherche aujourd'hui est de trouver les meilleurs PS, afin de surmonter ces problèmes et par conséquent améliorer leur efficacité en PDT. Les complexes de ruthénium (Ru) avec des ligands polypyridyles conjugués à la porphyrine ont reçu beaucoup d'attention en raison de leurs propriétés intéressantes en tant qu'agents photoactifs de clivage de l'ADN. Pour contourner le problème de la solubilité et de la stabilité des PS à base de Ru, les assemblages métalliques ont commencé à susciter un intérêt considérable en tant que systèmes de vectorisation pour ces complexes. Considérés comme des molécules sensibles et instables, ces assemblages jouent le rôle de protection et d'isolement de ces PS.

Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur l'évaluation de l'efficacité anticancéreuse des cages cubiques d'arène-Ru portant dans leur propre structure deux unités de PS de tétrapyrrolyporphine (TPyP) comme un système de vectorisation intéressant. En outre, pour démontrer l'influence du métal de ces assemblages sur la photoactivité des PS, nous avons examiné la présence d'un métal diamagnétique (Zn^{2+}) au centre du tétrapyrrole de la TPyP (Zn-TPyP). L'objectif de ces travaux de recherche a été d'évaluer en premier lieu l'effet anticancéreux de ces nouveaux PS fonctionnalisés par des cages de Ru *in vitro* sur deux lignées cellulaires humaines de CCR, HCT116 et HT-29 ; deuxièmement de comparer l'influence du métal sur la photoactivité des PS. Ensuite, le troisième objectif de ce travail a été basé sur la compréhension du processus de mort cellulaire engendré par ces deux molécules afin d'entraîner leur effet anti-cancéreux.

Matériels et méthodes

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 (SVF), la L-glutamine, la solution de pénicilline/streptomycine et le collagène de type I ont été fournis par Gibco BRL (Cergy-Pontoise, France). Le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT), l'anticorps anti- β -actine humaine, l'acide acétique et le kit "Cell death detection enzyme-linked immunosorbent assay^{PLUS} (ELISA)" proviennent de Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Les anticorps anti-caspase-3, anti-caspase-3 clivée, anti-PARP, anti-Bax, anti-Bcl-2 humains et l'anticorps secondaire IgG H&L anti-lapin couplé à la peroxydase de raifort (HRP) proviennent de Cell Signaling Technology - Ozyme (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Le kit de détection des ERO cellulaires contenant du diacétate de 2',7'-dichlorofluorescéine (DCFDA) a été acheté chez Abcam (Paris, France). Le LysoTracker, le MitoTracker, le RETracker, l'anticorps secondaire anti-IgGG-IgM H&L de souris couplé à la HRP, le kit « Alexa Fluor® 488 annexin V/Dead Cell Apoptosis » et l'iodure de propidium (IP), le tampon d'échantillon 5X (Pierce™ Lane Marker Reducing Sample Buffer), la membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF), et le marqueur de poids moléculaires (PageRuler Plus Prestained Protein Ladder) proviennent de Thermo Fisher Scientific (Villebon-sur-Yvette, France). Le substrat HRP chimioluminescent Immobilon Western, la RNase A et l'inhibiteur de protéases (Complete™, Mini Protease Inhibitor Cocktail) ont été obtenus auprès de Merck (Lyon, France) et le réactif caspase-3/7 auprès de Sartorius (Göttingen, Allemagne).

I.2. Synthèse et application de TPyP et Zn-TPyP-arène-Ru

Les composés TPyP-arène-Ru et Zn-TPyP-arène-Ru ont été synthétisés et purifiés par notre collaborateur à l'Université de Neuchâtel (Suisse) [218]. Le chlorure de Ru (III) hydraté, le 1-isopropyl-4-méthylcyclohexane-1,4-diène, la 5,10,15,20-tétra(4-pyridyl)-21H,23H-porphine et la 5,10,15,20-tétra(4-pyridyl)-21H,23H-porphine de zinc ont été acquis auprès de Sigma-Aldrich. Tous les tests *in vitro* et toutes les manipulations ont été réalisés sous atmosphère aseptique et dans des conditions de stérilité constantes. Les PS ont été préparés à une concentration de 1 mM dans le DMSO, puis dilués dans le milieu de culture complet à la concentration nécessaire et immédiatement avant leur utilisation. La concentration finale de DMSO dans le milieu de culture était inférieure à 0,1 % dans toutes les conditions.

I.3. Lignées cellulaires et culture

Les lignées cellulaires étudiées sont les lignées humaines HCT116 et HT-29 de CRC. Elles proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC) (LGC Standards, Molsheim,

France). La lignée HCT116 a été isolée à partir d'un carcinome colorectal de stade I d'un homme adulte. La lignée HT-29 est issue d'un adénocarcinome colorectal de stade II d'une femme de 44 ans. Les deux lignées cellulaires HCT116 et HT-29 ont étéensemencées respectivement dans un milieu de culture RPMI 1640 et DMEM. Ces milieux ont été complétés par 10% de SVF, 1% de L-glutamine et 1% de solution de pénicilline/streptomycine à 100 U/mL et 100 µg/mL respectivement. Toutes les lignées cellulaires ont été cultivées dans une atmosphère humide contenant 5% de CO₂ dans un incubateur à régulation thermostatique à 37°C. Pour toutes les expériences *in vitro*, les lignées cellulaires ont étéensemencées à 1,2 x10⁴ et 2,1x10⁴ cellules/cm² pour les cellules HCT116 et HT-29 respectivement. La numération des cellules viables a été réalisée en utilisant le test d'exclusion au bleu Trypan sur une cellule de Malassez.

I.4. Traitements et irradiations

Après 36h d'adhérence, les cellules ont été traitées ou non pendant une période de 24h. Les solutions mères de TPyP-arène-Ru et de Zn-TPyP-arène-Ru ont été diluées dans le milieu de culture pour obtenir les concentrations finales appropriées. Après la période de traitement, le milieu de culture a été remplacé par le milieu de culture correspondant sans rouge de phénol. Les cellules ont ensuite été irradiées ou non avec une lumière rouge entre 630-660 nm à une fluence de 75 J/cm² en utilisant la lampe CURElight (PhotoCure ASA, Oslo, Norvège).

I.5. Étude de la viabilité cellulaire

La viabilité des cellules a été évaluée par le test MTT. Ce test est basé sur la réduction du sel de tétrazolium du MTT en cristaux de formazan par une enzyme mitochondriale, la succinate déshydrogénase. Cette réduction forme un précipité violet dans les mitochondries. La quantité de précipité formé est proportionnelle au nombre de cellules vivantes. Après solubilisation des cristaux avec du DMSO, la densité optique à 550 nm est déterminée par spectrophotométrie permettant de déterminer la quantité relative de cellules vivantes. Ce test est utilisé pour comparer la viabilité des cellules traitées, photoactivées ou non, par rapport aux cellules témoins.

Les cellules HCT116 et HT-29 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à la densité déterminée et cultivées pendant 36 h dans 100 µL de milieu de culture correspondant. Pour chaque condition analysée, 6 puits ont été réalisés et au moins 3 expériences indépendantes (n=3). Après 36h de croissance cellulaire, les cellules ont été traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru pendant 24h. Le milieu a ensuite été remplacé par 100 µL de milieu de culture dépourvu de rouge de phénol puis les cellules ont été irradiées ou non. Après 24 et 48h, 10 µL d'une solution de MTT (à 5 mg/mL dans une solution saline tampon phosphate (PBS)) ont été ajoutés dans chaque puits. Après 3h d'incubation à 37°C, le milieu a été retiré puis 100 µL de DMSO ont été ajoutés par puits pour lyser les membranes cellulaires et libérer les cristaux de formazan formés. L'absorbance de chaque puits a ensuite été mesurée à 550 nm par un spectrophotomètre (Thermoscientific, Multiskan FC). Les blancs de lecture correspondent aux puits contenant uniquement 100 µL de DMSO. Les résultats de la viabilité cellulaire sont présentés en pourcentage par rapport aux cellules témoins : (DO moyenne des cellules traitées / DO moyenne des cellules témoins) x 100 ± SEM. Les IC₅₀ pour chaque lignée

cellulaire et chaque molécule correspond à la concentration à laquelle seulement 50% des cellules sont viables par rapport aux cellules témoins.

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

La production cellulaire des ERO a été quantifiée à l'aide du kit "2',7'-dichlorofluorescein diacetate cellular reactive oxygen species detection assay kit". Cette technique est basée sur l'utilisation du DCFDA. Après diffusion dans la cellule, le DCFDA sera désacétylé par les estérases cellulaires en un composé non fluorescent. Ce dernier sera ensuite oxydé par les ERO cellulaires conduisant à la formation de la 2',7'-dichlorofluorescéine (DCF). La DCF est un composé fluorescent qui peut être détecté par cytométrie en flux (excitation : 485 nm ; émission : 535 nm). Le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) a été utilisé comme contrôle positif à 800 μM . Les cellules HT-29 ont étéensemencées dans des flacons de culture de 25 cm^2 à la densité déterminée et cultivées pendant 36h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC_{50} déterminées. Après 24h d'incubation, les cellules ont été marquées avec du DCFDA pendant 30 min à 37°C. Les cellules ont ensuite été lavées, le milieu a été remplacé par du milieu correspondant sans rouge de phénol, puis irradiées ou non. La génération cellulaire des ERO a ensuite été quantifiée 1h après irradiation par analyse de cytométrie en flux.

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

a- Cytométrie en flux avec imagerie AMNIS

Les cellules HCT116 et HT-29 ont étéensemencées dans des flacons de culture de 25 cm^2 selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h. Les cellules ont ensuite été traitées avec la TPyP-arene-Ru ou la Zn-TPyP-arene-Ru aux IC_{50} déterminées. Après 24 et 48h d'incubation, la fluorescence naturelle de la TPyP-arène-Ru (excitation : 405 nm ; émission : 650 nm) ou de la Zn-TPyP-arène-Ru (excitation : 561 nm ; émission : 655 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). Les cellules ont été cultivées et traitées comme décrit précédemment puis co-traitées à 37°C avec du MitoTracker à 150 nM pendant 45 min ou du LysoTracker à 100 nM pendant 45 min ou du RETracker à 600 nM pendant 40 min. Les fluorescences de la TPyP-arène-Ru, de la Zn-TPyP-arène-Ru, du MitoTracker (excitation : 490 nm ; émission : 516 nm), du LysoTracker (excitation 400 nm ; émission 464 nm) et du RETracker (excitation : 504 nm ; émission : 511 nm) ont été analysées et les co-localisations entre la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru et les Lyso/Mito/RE Trackers ont été déterminées grâce au coefficient de corrélation de Pearson.

b- Microscopie confocale

Pour confirmer la localisation intracellulaire des composés TPyP-arène-Ru et Zn-TPyP-arène-Ru, les cellules ont étéensemencées pendant 36h dans une chambre d'incubation (ibidi) recouverte d'acide acétique (20 mM) et de collagène de type I (3 mg/mL). Ensuite, les cellules ont été traitées aux IC_{50} déterminées. Après 24h de traitement, les cellules ont été co-traitées comme décrit précédemment à 37°C avec du MitoTracker à 150 nM pendant 45 min ou du LysoTracker à 100 nM pendant 45 min ou du RETracker à 600 nM pendant 40 min. Les

fluorescences intracellulaires de la TPyP-arène-Ru, de la Zn-TPyP-arène-Ru, du MitoTracker (excitation : 490 nm ; émission : 516 nm), du LysoTracker (excitation : 400 nm ; émission : 464 nm) et du RETracker (excitation : 504 nm ; émission : 511 nm) ont été analysées par microscopie. Des photos ont été prises grâce au microscope confocal Laser Carl Zeiss LSM 510 Meta – x1000 (Marly le Roi, France). La co-localisation a été analysée grâce au logiciel de traitement d'images ImageJ.

I.8. Analyse du cycle cellulaire

La distribution dans les différentes phases du cycle cellulaire des lignées HT-29 et HCT116 a été analysée par cytométrie en flux en utilisant le marquage à l'IP. Les cellules ont été ensemencées dans des flacons de culture de 75 cm² selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol et les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Des culots de 1,5×10⁶ cellules de chaque condition ont été collectés, lavés avec du PBS, et fixés en ajoutant 1 mL d'éthanol glacé à 70% dans du PBS. Après la fixation, les cellules ont été culottées, lavées dans du PBS froid, remises en suspension dans 500 µL de PBS 1X contenant 30 µL de RNase A (10 mg/mL), et incubées pendant 30 min à température ambiante. Les cellules ont été ensuite marquées à l'IP (50 µg/mL) juste avant analyse par cytométrie en flux à l'aide d'un analyseur trieur FACS Calibur. Les résultats ont été présentés sous forme de cytogrammes : pic du signal de fluorescence (FL3, fluorescence de l'IP) en fonction du nombre de cellules passées. Un minimum de 1x10⁶ cellules est analysé avec une vitesse de passage de 300 cellules/s. L'analyse de la distribution des cellules selon leur quantité en ADN (différentes phases du cycle cellulaire) est réalisée à partir des cytogrammes précédents avec le logiciel ModFit LT (Verity Software, USA).

I.9. Analyse de l'expression des protéines

Les cellules HCT116 et HT-29 ont été ensemencées dans des flacons de culture de 25 cm² selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu de culture dépourvu de rouge de phénol et les cellules ont ensuite été irradiées ou non. 24 et 48h après irradiation, les cellules pour chaque condition ont été récupérées, lavées dans du PBS, puis culottées après centrifugation à 1500 trs/min pendant 5 min à 4°C.

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 trs/min 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) en solution aqueuse et en présence de tampon d'échantillon 5X ont été dénaturées 5 min à 95°C. Les protéines ont ensuite été séparées sur un gel d'électrophorèse dénaturant (SDS-PAGE) (12%). La migration a été effectuée pendant environ 2h 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 1h30. La membrane a ensuite été incubée pendant au moins 1h dans du tampon de blocage (TBS 1X-Lait 5%) sous agitation à température ambiante afin de saturer les sites aspécifiques. L'anticorps primaire a été incubé dans du tampon de blocage une nuit sous agitation à 4°C. La membrane est ensuite rincée plusieurs fois dans du tampon de rinçage (TBS 1X-Tween 0,1%) avant d'être incubée avec l'anticorps secondaire correspondant sous agitation à température ambiante pendant 1h. La membrane est ensuite rincée dans du tampon de lavage afin d'éliminer l'excès d'anticorps secondaire. 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 à un marqueur de poids moléculaires. La β -actine a été utilisée comme protéine de référence (**Tableau 12**).

Tableau 12 : Exemples de PS inorganiques.

Protéines	Source	Dilution
Caspase-3	Souris	1/1000 ^{ème}
Caspase-3 clivée	Lapin	1/1000 ^{ème}
PARP	Lapin	1/1000 ^{ème}
Bax	Lapin	1/1000 ^{ème}
Bcl-2	Lapin	1/1000 ^{ème}
β -actine	Souris	1/5000 ^{ème}

I.10. Étude de la mort cellulaire

Pour toutes les études sur la mort cellulaire les cellules HCT116 et HT-29 ont étéensemencées dans des flacons de culture de 25 cm² selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol et les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Pour l'analyse de

l'activation des caspases-3/-7, les cellules ont étéensemencées dans des plaques 96 puits à la densité déterminée et cultivées pendant 36h. Pour chaque condition analysée, 3 puits ont été réalisés et au moins 3 expériences indépendantes ont été réalisées (n=3).

I.10.1. Analyse multiparamétrique de l'apoptose par marquage à l'annexine V et l'iodure de propidium

Cette technique d'analyse de l'apoptose est basée sur l'utilisation de l'annexine V qui est une protéine ayant une forte affinité pour les phosphatidylsérines. En couplant 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 sont exposées vers le compartiment intracellulaire. Dans des conditions normales, les cellules seront négatives à l'annexine V. En revanche, un des premiers événements précoces de l'apoptose cellulaire est le phénomène de flip flop ATP-dépendant réalisé par l'enzyme flipase qui conduit à la translocation des phosphatidylsérines exposées vers l'extérieur de la membrane plasmique. Les cellules entrant dans le processus apoptotique seront donc positives à l'annexine V. Afin de discriminer les cellules en phase précoce et tardive du processus apoptotique, l'annexine V est couplée à l'IP. 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 dans la phase tardive de l'apoptose ou pendant la nécrose. Les cellules viables sont annexine V_{nég.} / IP_{nég.} ; les cellules en apoptose précoce : annexine V_{pos.} / IP_{nég.} et les cellules en apoptose tardive : annexine V_{pos.} / IP_{pos.} La condition correspondant à l'annexine V_{nég.} / IP_{pos.} concerne les débris nucléaires. Des culots cellulaires de $2,5 \times 10^5$ cellules ont été récupérés 24 et 48 h après irradiation. Les culots ont ensuite été repris dans 100 μ L de tampon d'annexine V et les cellules ont été marquées avec 5 μ L d'annexine V-FITC et 1 μ L d'IP (0,1 mg/mL) pendant 15 min à température ambiante. Ensuite, 200 μ L de tampon d'annexine V sont ajoutés avant que le pourcentage de cellules en apoptose soit déterminé par cytométrie en flux à l'aide de l'analyseur trieur FACS Calibur.

I.10.2. 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) en présence du 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 verte est alors détectée au niveau des noyaux lorsque les cellules sont en phase apoptotique.

Les cellules HCT116 et HT-29 ont étéensemencées en plaques 96 puits selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, le

milieu de culture 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 (5 μM) et placées dans le système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte[®] S3. Toutes les 6h, des images des cellules ont été prises à hauteur de 4 images par puits en contraste de phase et en fluorescence verte en utilisant un grossissement x10. La quantité de cellules en apoptose a été quantifiée avec le logiciel IncuCyte[®] (Sartorius) en utilisant le rapport du nombre de cellules fluorescentes par rapport au nombre de cellules totales dans chaque puits au cours du temps pendant 48h.

I.10.3. 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}"[219]. Des culots cellulaires de 2×10^5 cellules ont été récupérés 24 et 48 h après irradiation. Chaque culot cellulaire a ensuite été repris dans 400 μL de tampon de lyse pendant 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 2h d'incubation sous agitation à 300 trs/min à l'obscurité, 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 streptavidine. Après trois 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. La réaction est ensuite stoppée et la densité optique pour chaque condition est 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) sont ensuite déterminées pour chaque condition et comparées aux valeurs obtenues pour les conditions témoins. La quantité de fragmentation de l'ADN 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 \pm 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 indépendantes ont été réalisées au moins 3 fois.

Partie expérimentale

Chapitre I. Expérimentations in vitro

I.1. Étude de la viabilité cellulaire

Dans le but d'évaluer l'effet phototoxique des deux composés, deux lignées cellulaires humaines HCT116 et HT-29 de CRC ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non par une gamme de concentrations croissantes avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol puis les cellules ont été soumises à une irradiation ou non. La viabilité des cellules HCT116 (**Figures 58 et 59**) et des cellules HT-29 (**Figures 60 et 61**) a alors été analysée à 24 et 48h après irradiation par le test MTT. Les valeurs d'IC₅₀ pour chaque composé et chaque lignée cellulaire ont ensuite été calculées en vue de les comparer (**Tableaux 13 et 14**).

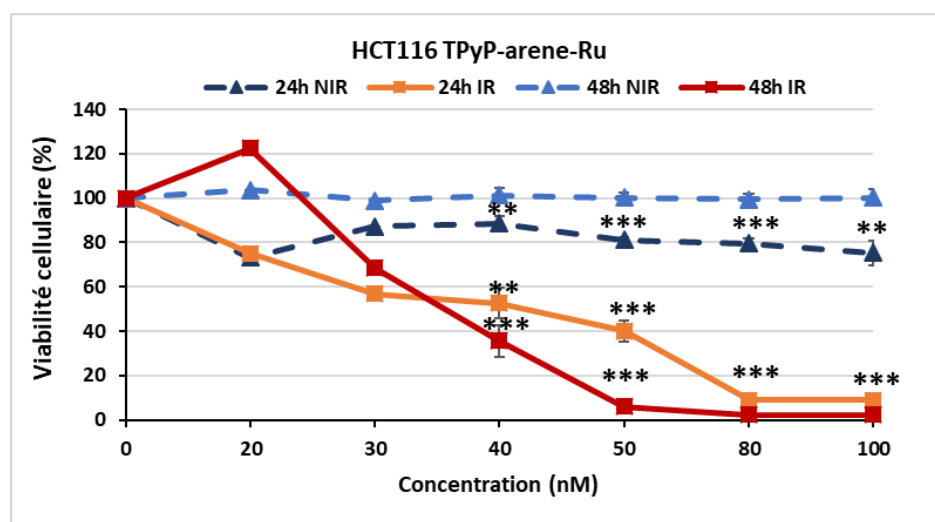


Figure 58 : Effets photocytotoxiques de la TPyP-arène-Ru sur les cellules HCT116 à 24 et 48h.

Les cellules HCT116 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits et cultivées pendant 36h avant d'être traitées ou non par la TPyP-arène-Ru. Après 24h d'incubation, les cellules ont été irradiées ou non avec une lampe CURElight de 630-660 nm à 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norvège). Des tests MTT ont été réalisés à 24 et 48h après irradiation et la viabilité cellulaire a été exprimée en pourcentage de chaque condition de traitement par rapport aux cellules non traitées. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (n = 3). ** p < 0,01 et *** p < 0,001. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

Les résultats ont montré que la TPyP-arène-Ru ainsi que la Zn-TPyP-arène-Ru n'induisaient aucun effet cytotoxique sur les deux lignées cellulaires HCT116 et HT-29 lorsque les cellules étaient maintenues à l'obscurité à 24 et 48h post-traitements (**Figures 58 à 61**). Les deux composés donnent des résultats correspondant à l'un des critères idéaux d'un PS, c'est à dire la non-toxicité en absence de lumière.

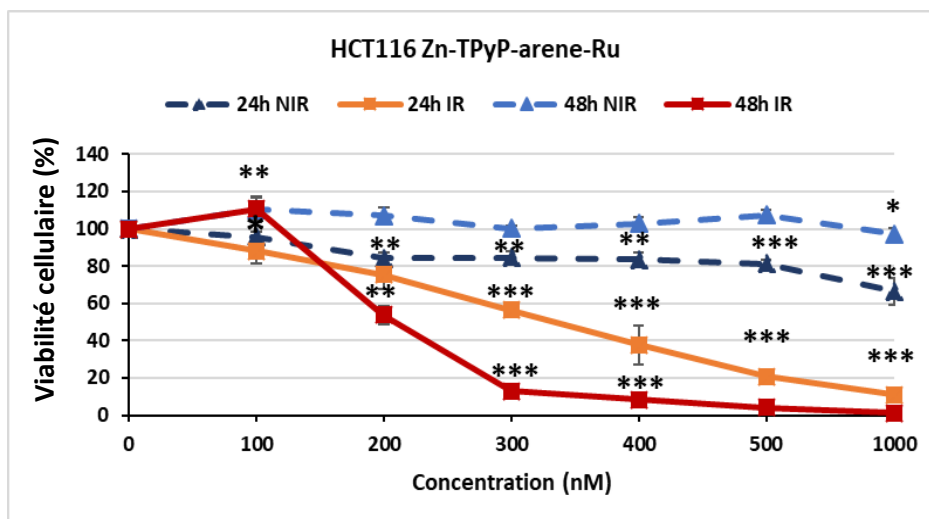


Figure 59 : Effets photocytotoxiques de la Zn-TPyP-arène-Ru sur les cellules HCT116 à 24 et 48h.

Les cellules HCT116 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits et cultivées pendant 36h avant d'être traitées ou non par la Zn-TPyP-arène-Ru. Après 24h d'incubation, les cellules ont été irradiées ou non avec une lampe CURElight de 630-660 nm à 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norvège). Des tests MTT ont été réalisés à 24 et 48h après irradiation et la viabilité cellulaire a été exprimée en pourcentage de chaque condition de traitement par rapport aux cellules non traitées. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 3). * p < 0,05 ; ** p < 0,01 et *** p < 0,001. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

En revanche, après photoactivation par PDT, les résultats ont révélé que les deux composés TPyP-arène-Ru-PDT et Zn-TPyP-arène-Ru-PDT conduisent à une diminution significative de la viabilité cellulaire de manière dose et temps-dépendant sur les deux lignées cellulaires. Cependant, la TPyP-arène-Ru-PDT a présenté une phototoxicité plus importante que celle obtenue pour la Zn-TPyP-arène-Ru-PDT (**Figures 58 à 61**).

Les valeurs d'IC₅₀ ont été déterminées puis comparées afin de vérifier l'impact de la présence d'un métal diamagnétique (Zn²⁺) au centre de l'anneau du tétrapyrrole dans les panels de TPyP après photoactivation par PDT. Nous avons observé que la combinaison TPyP-arène-Ru-PDT était beaucoup plus efficace que celle de la Zn-TPyP-arène-Ru-PDT dans la lignée cellulaire HCT116 avec une cytotoxicité de presque 8 fois plus importante dès 24h après irradiation. En effet, les valeurs d'IC₅₀ sont de 41,89 nM pour la TPyP-arène-Ru-PDT par rapport à 331,23 nM pour la Zn-TPyP-arène-Ru-PDT. Les composés ont révélé plus de cytotoxicité à 48h avec des valeurs d'IC₅₀ plus faibles : 35,24 nM pour la TPyP-arène-Ru-PDT et 207,45 nM pour la Zn-TPyP-arène-Ru-PDT (**Tableau 13**).

Tableau 13 : Valeurs d'IC₅₀ (nM) déterminées sur les cellules HCT116.

PS	IC ₅₀ /PDT 24h	IC ₅₀ /PDT 48h	IC ₅₀ /Obscurité
TPyP-arene-Ru	41,89	35,24	> 100
Zn-TPyP-arene-Ru	331,23	207,45	> 1000

Des résultats similaires ont été observés sur la lignée cellulaire HT-29 avec une efficacité de presque 6 fois supérieure pour la TPyP-arène-Ru-PDT (67,82 nM) par rapport à la Zn-TPyP-arène-Ru-PDT (393,89 nM) à 24h. Ces valeurs diminuent légèrement à 48h post-irradiation pour être respectivement de 54,10 nM pour la TPyP-arène-Ru-PDT et de 379,29 nM pour la Zn-TPyP-arène-Ru-PDT (**Tableau 14**).

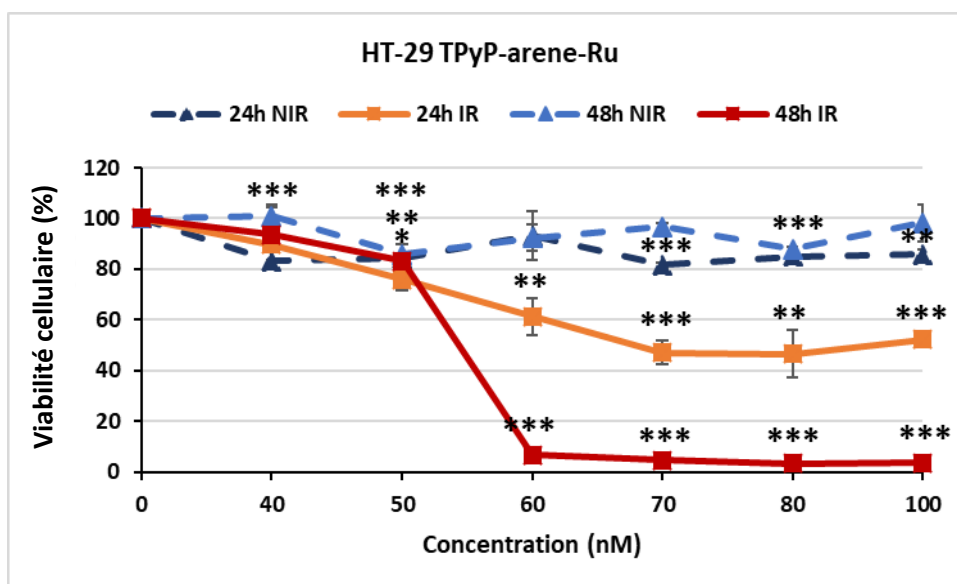


Figure 60 : Effets photocytotoxiques de la TPyP-arène-Ru sur les cellules HT-29 à 24 et 48h.

Les cellules HT-29 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits et cultivées pendant 36h avant d'être traitées ou non par la TPyP-arène-Ru. Après 24h d'incubation, les cellules ont été irradiées ou non avec une lampe CURElight de 630-660 nm à 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norvège). Des tests MTT ont été réalisés à 24 et 48h après irradiation et la viabilité cellulaire a été exprimée en pourcentage de chaque condition de traitement par rapport aux cellules non traitées. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 3). * p < 0,05 ; ** p < 0,01 et *** p < 0,001. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

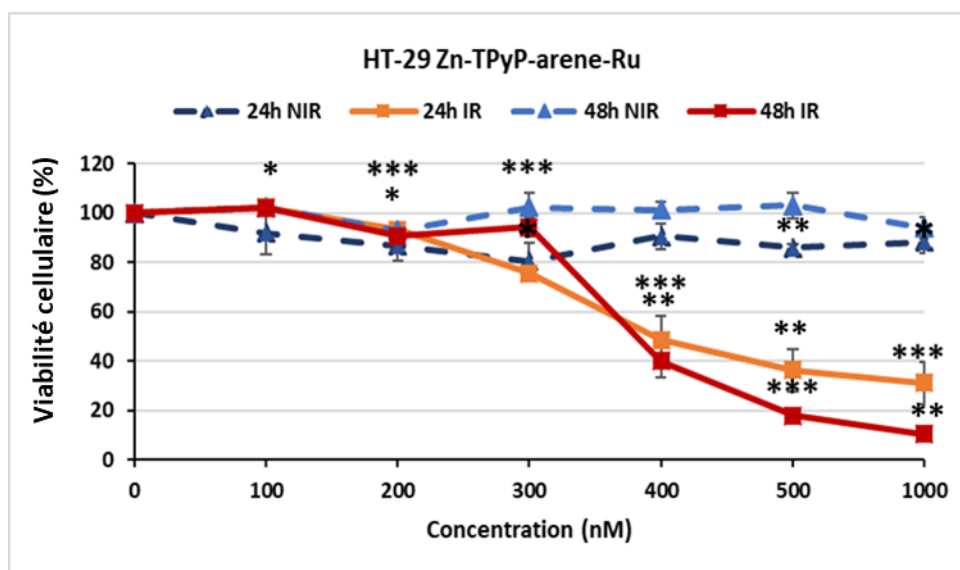


Figure 61 : Effets photocytotoxiques de la Zn-TPyP-arène-Ru sur les cellules HT-29 à 24 et 48h.

Les cellules HT-29 ont étéensemencées dans des plaques 96 puits et cultivées pendant 36h avant d'être traitées ou non par la TPyP-arène-Ru. Après 24h d'incubation, les cellules ont été irradiées ou non avec une lampe CURElight de 630-660 nm à 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norvège). Des tests MTT ont été réalisés à 24 et 48h après irradiation et la viabilité cellulaire a été exprimée en pourcentage de chaque condition de traitement par rapport aux cellules non traitées. Les données sont présentées sous forme de moyenne ± SEM (n = 3). * p < 0,05 ; ** p < 0,01 et *** p < 0,001. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

Tableau 14 : Valeurs d'IC₅₀ (nM) déterminées sur les cellules HT-29

PS	IC ₅₀ /PDT 24h	IC ₅₀ /PDT 48h	IC ₅₀ /Obscurité
TPyP-arène-Ru	67,82	54,10	> 100
Zn-TPyP-arène-Ru	393,89	379,29	> 1000

Pour la suite des expérimentations, les composés TPyP-arène-Ru et Zn-TPyP-arène-Ru ont été utilisés aux valeurs d'IC₅₀ déterminées pour chaque lignée cellulaire.

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

La mort cellulaire induite par la PDT étant fondée sur la production cellulaire d'ERO, cette production a été quantifiée dans les cellules HT-29, généralement plus résistantes aux traitements. Les cellules ont étéensemencées à la densité déterminée et cultivées pendant 36h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, les cellules ont été marquées avec du DCFDA. Ensuite, le milieu de culture a été remplacé par un milieu dépourvu de rouge de phénol et les cellules ont été soumises ou non à une irradiation. Le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) a été utilisé comme contrôle positif. A 1h post-irradiation, la production cellulaire d'ERO a ensuite été quantifiée par cytométrie en flux et interprétée à l'aide du pourcentage de fluorescence positive (Figure 62).

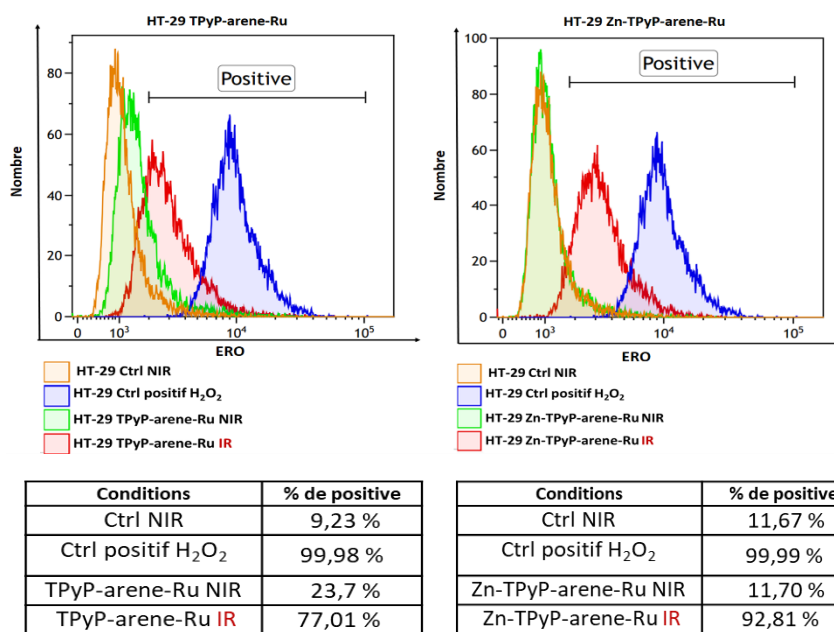


Figure 62 : Dosage des ERO dans les cellules HT-29

Les cellules HT-29 ont été traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru à IIC₅₀ déterminée. Les cellules ont ensuite été marquées avec du DCFDA puis irradiées ou non. La production d'ERO a ensuite été quantifiée par cytométrie en flux et interprétée grâce au % de fluorescence positive données dans les tableaux. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

Les résultats ont montré que lorsque les cellules ne sont ni traitées ni irradiées, la production d'ERO est faible avec des pourcentages compris entre 9 et 12% (Ctrl NIR). Ce pourcentage augmente légèrement après le traitement des cellules par la TPyP-arène-Ru (23,7%) mais ne varie pas en présence de Zn-TPyP-arène-Ru par rapport aux cellules témoins. Cela signifie que les traitements avec les composés seuls n'induisent peu ou pas de production d'ERO. En revanche, lorsque les cellules sont traitées par les composés puis photoactivées par PDT, la production d'ERO mesurée 1h après irradiation, augmente fortement pour atteindre 77,01 et 92,81% respectivement pour la TPyP-arène-Ru et la Zn-TPyP-arène-Ru.

I.3. Étude de l'internalisation cellulaire

Les porphyrines sont connues pour présenter une faible solubilité dans les milieux biologiques en raison de leur importante hydrophobicité. Dans le but de contourner les problèmes de solubilité et d'empêcher l'auto-agrégation, les porphyrines ont été fonctionnalisées par des assemblages métalliques à base de Ru. Les effets phototoxiques significatifs de nos complexes peuvent être dus à l'amélioration de l'internalisation cellulaire des porphyrines TPyP et Zn-TPyP. Cette internalisation peut être la conséquence de la forte affinité du Ru pour les sites de liaison de la transferrine hautement présents dans les cellules tumorales.

Dans le but de confirmer la pénétration cellulaire de nos complexes et si possible la localisation au sein de certains organites, une étude concernant l'internalisation et la co-localisation de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru a été réalisée par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS[®] et par microscopie confocale.

a-Étude de la localisation cellulaire des TPyP-arène-Ru et Zn-TPyP-arène-Ru par analyse d'images AMNIS®.

En vue de confirmer la localisation de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru au niveau des organites cellulaires, des analyses de localisation cellulaire ont d'abord été menées par cytométrie en flux couplée à une analyse d'images AMNIS®.

Les cellules HCT116 et HT-29 ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h. Les cellules ont ensuite été traitées avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru. Après 24h d'incubation, les cellules ont été co-traitées avec du Mito-Tracker, du Lyso-Tracker ou du RE-Tracker. Les fluorescences de la TPyP-arène-Ru (excitation : 405 nm ; émission : 650 nm) ou de la Zn-TPyP-arène-Ru (excitation : 561 nm ; émission : 655 nm), du Mito-Tracker (excitation : 490 nm ; émission : 516 nm), du Lyso-Tracker (excitation : 400 nm ; émission : 464 nm) et du RE-Tracker (excitation : 504 nm ; émission : 511 nm) ont été analysées et la co-localisation entre la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru et les Mito/Lyso/RE-Trackers ont été déterminées grâce au coefficient de corrélation de Pearson.

Les résultats ont tout d'abord montré l'internalisation cellulaire de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru, visible par la présence de fluorescence rouge dans les cellules. De plus, quelle que soit la lignée cellulaire concernée, l'internalisation cellulaire semble être la même pour les deux complexes (**Figures 63 à 66**).

Les résultats préliminaires concernant la localisation ont montré que la TPyP-arène-Ru serait préférentiellement localisée dans le RE alors que la Zn-TPyP-arène-Ru aurait une localisation plutôt dans la mitochondrie. Les deux complexes n'ont pas été co-localisés dans le lysosome (résultats non présentés) (**Tableaux 15 et 16**) (**Figures 63 à 66**).

En effet, sur les cellules HCT116 (**Figures 63 et 64**), la TPyP-arène-Ru a été co-localisée dans le RE avec un pourcentage de 8% des cellules marquées alors qu'elle n'a pas été retrouvée dans les mitochondries ni dans les lysosomes. La Zn-TPyP-arène-Ru a été co-localisée dans les mitochondries avec un pourcentage de 18% des cellules marquées mais n'a pas été localisée dans le RE ni dans les lysosomes (**Tableau 15**).

Tableau 15 : Pourcentage de co-localisation des deux complexes dans les cellules HCT116.

HCT116			
	Mito-Tracker	Lyso-Tracker	RE-Tracker
TPyP-arene-Ru	Pas de colocalisation	Pas de colocalisation	8 %
Zn-TPyP-arene-Ru	18 %	Pas de colocalisation	Pas de colocalisation

Le tableau résume le pourcentage de colocalisation de la TPyP-arène-Ru ou de la Zn-TPyP-arène-Ru avec les Mito/Lyso/RE-Trackers.

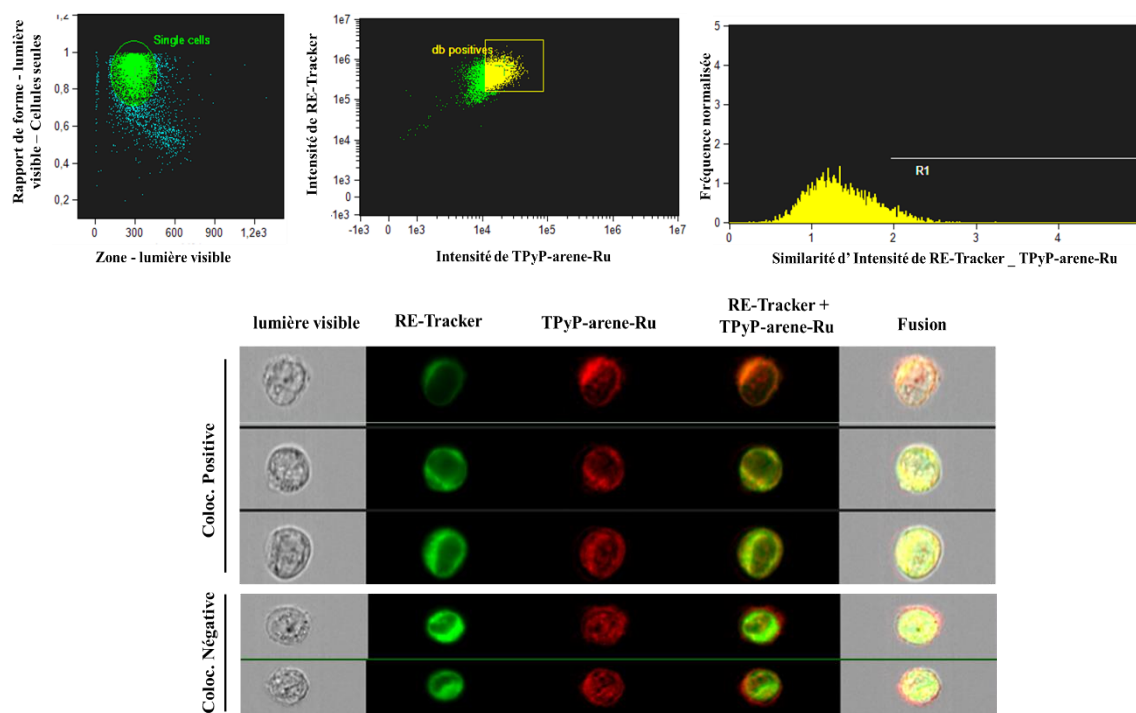


Figure 63 : Etude de la localisation cellulaire de la TPyP-arène-Ru par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® dans les cellules HCT116.

Les cellules HCT116 ont été traitées avec la TPyP-arène-Ru à IC_{50} déterminée. Après 48h d'incubation, les cellules ont été co-traitées avec du RE-Tracker. Les fluorescences de la TPyP-arène-Ru (excitation : 405 nm ; émission : 650 nm) et du RE-Tracker (excitation : 504 nm ; émission : 511 nm) ont été analysées par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® et la co-localisation entre la TPyP-arène-Ru et le RE-Tracker a été déterminée grâce au coefficient de corrélation de Pearson. Le 1^{er} graphique représente le rapport taille/structure des cellules HCT116. Le 2nd graphique représente l'intensité du RE-Tracker/ Intensité de TPyP-arène-Ru après sélection de la population où les cellules sont doubles positives. Enfin, le 3^{ème} graphique représente la similarité des cellules de la population sélectionnée avec le RE-Tracker. Des images représentatives montrent les différentes conditions de co-localisation.

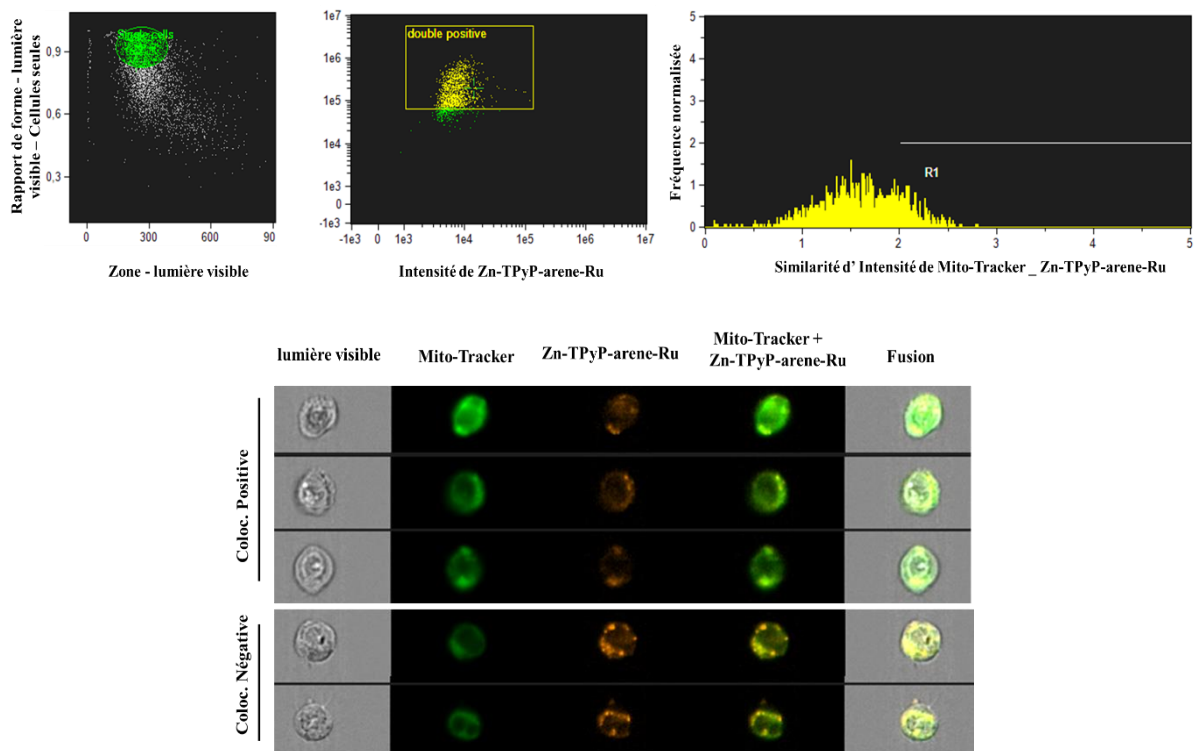


Figure 64 : Etude de la localisation cellulaire de la Zn-TPyP-arène-Ru par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® dans les cellules HCT116.

Les cellules HCT116 ont été traitées avec la Zn-TPyP-arène-Ru à IIC₅₀ déterminée. Après 48h d'incubation, les cellules ont été co-traitées avec du Mito-Tracker. Les fluorescences de la Zn-TPyP-arène-Ru (excitation : 561 nm ; émission : 655 nm) et du Mito-Tracker (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 la Zn-TPyP-arène-Ru et le Mito-Tracker a été déterminée grâce au coefficient de corrélation de Pearson. Le 1^{er} graphique représente le rapport taille/structure des cellules HCT116. Le 2nd graphique représente l'intensité du Mito-Tracker/ Intensité de Zn-TPyP-arène-Ru après sélection de la population où les cellules sont doubles positives. Enfin, le 3^{ème} graphique représente la similarité des cellules de la population sélectionnée avec le Mito-Tracker. Des images représentatives montrent les différentes conditions de co-localisation.

Des résultats similaires sont retrouvés sur les cellules HT-29 (**Figures 65 et 66**) dans lesquelles la TPyP-arène-Ru et la Zn-TPyP-arène-Ru ont été co-localisées avec le RE et les mitochondries respectivement. En effet, la TPyP-arène-Ru a été co-localisée dans le RE avec un pourcentage de 9% des cellules marquées mais n'était pas présente dans les mitochondries ni dans les lysosomes. La Zn-TPyP-arène-Ru a été co-localisée dans les mitochondries avec un pourcentage de 38% des cellules marquées alors qu'elle n'a pas été localisée dans le RE ni dans les lysosomes (**Tableau 16**).

Tableau 16 : Pourcentage de co-localisation des deux complexes dans les cellules HT-29.

HT-29

	Mito-Tracker	Lyso-Tracker	RE-Tracker
TPyP-arène-Ru	Pas de colocalisation	Pas de colocalisation	9 %
Zn-TPyP-arène-Ru	38 %	Pas de colocalisation	Pas de colocalisation

Le tableau résume le pourcentage de colocalisation de la TPyP-arène-Ru ou de la Zn-TPyP-arène-Ru avec les Mito/Lyso/RE-Trackers.

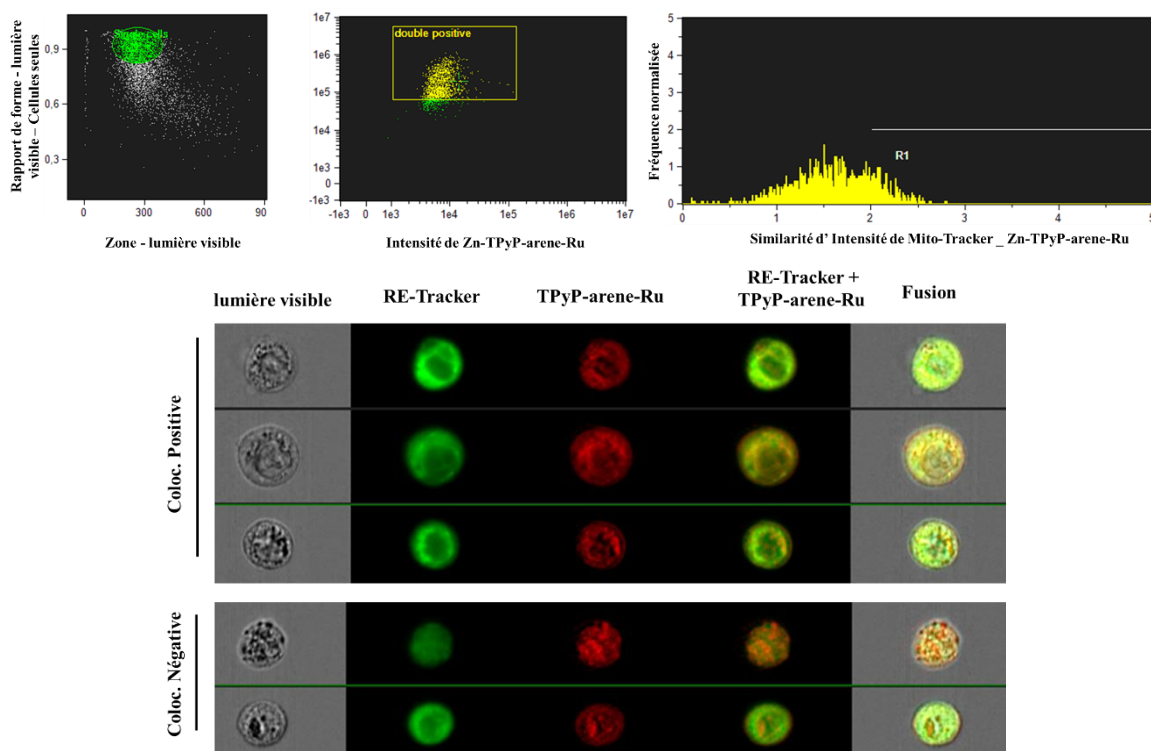


Figure 65 : Etude de la localisation cellulaire de la TPYP-arène-Ru par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® dans les cellules HT-29.

Les cellules HT-29 ont été traitées avec la TPYP-arène-Ru à IIC₅₀ déterminée. Après 48h d'incubation, les cellules ont été co-traitées avec le RE-Tracker. Les fluorescences de la TPYP-arène-Ru (excitation : 405 nm ; émission : 650 nm) et du RE-Tracker (excitation : 504 nm ; émission : 511 nm) ont été analysées par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® et la co-localisation entre la TPYP-arène-Ru et le RE-Tracker a été déterminée grâce au coefficient de corrélation de Pearson. Le 1^{er} graphique représente le rapport taille/structure des cellules HT-29. Le 2nd graphique représente l'intensité du RE-Tracker/Intensité de la TPYP-arène-Ru après sélection de la population où les cellules sont doubles positive. Enfin, le 3^{ème} graphique représente la similarité des cellules de la population sélectionnée avec le RE-Tracker. Des images représentatives montrent les différentes conditions de co-localisation.

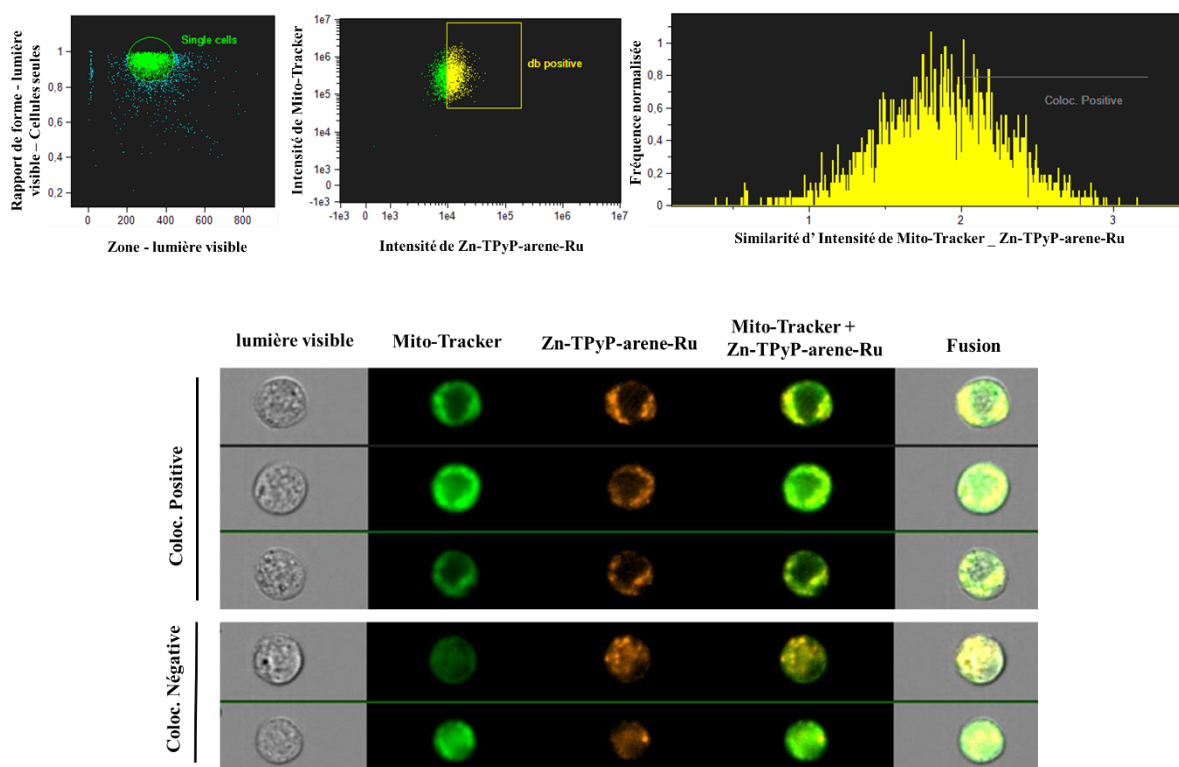


Figure 66 : Étude de la localisation cellulaire de la Zn-TPyP-arène-Ru par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® dans les cellules HT-29.

Les cellules HT-29 ont été traitées avec la Zn-TPyP-arène-Ru à l'IC₅₀ déterminée. Après 48h d'incubation, les cellules ont été co-traitées avec du Mito-Tracker. Les fluorescences de la Zn-TPyP-arène-Ru (excitation : 651 nm ; émission : 655 nm) et du Mito-Tracker (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 la Zn-TPyP-arène-Ru et le Mito-Tracker a été déterminée grâce au coefficient de corrélation de Pearson. Le 1^{er} graphique représente le rapport taille/structure des cellules HT-29. Le 2nd graphique représente l'intensité du Mito-Tracker/ Intensité de la Zn-TPyP-arène-Ru après sélection de la population où les cellules sont double positive. Enfin, le 3^{me} graphique représente la similarité des cellules de la population sélectionnée avec le Mito-Tracker. Des images représentatives montrent les différentes conditions de co-localisation.

b- Étude de la localisation cellulaire des TPyP-arène-Ru et Zn-TPyP-arène-Ru par microscopie confocale.

Dans le but de confirmer les premiers résultats d'internalisation cellulaire et de co-localisation des composés obtenus par l'analyse d'images AMNIS® en cytométrie en flux, la même étude a été entreprise en microscopie confocale.

Pour les analyses en microscopie confocale, les cellules ont étéensemencées en chambre d'incubation recouverte d'un revêtement composé de collagène de type I et d'acide acétique, selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h. Ensuite, les cellules ont été traitées avec la TPyP-arène-Ru et la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. En effet, ces deux composés présentent naturellement des propriétés fluorescentes dans le rouge d'où la possibilité de les localiser facilement au sein des deux lignées cancéreuses colorectales humaines HCT116 et HT-29.

Après 24h de traitement, les cellules ont été co-traitées par les Mito-, Lyso- ou RE-Trackers comme décrit précédemment. Les résultats observés ont confirmé l'internalisation cellulaire de

la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru (**Figure 67**) et le marquage individuel des différents organites dans les deux lignées cellulaires (**Figure 68**).

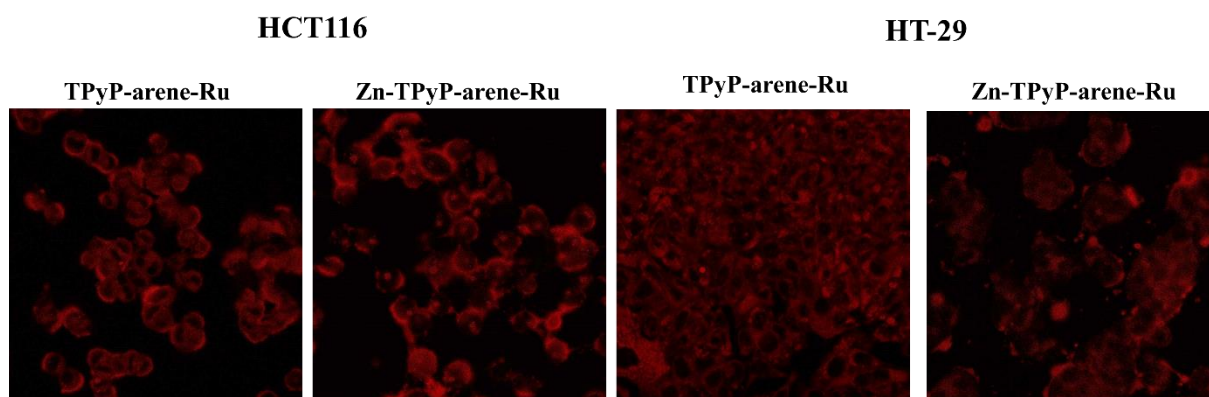


Figure 67 : Etude de l'internalisation cellulaire de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru par microscopie confocale

Les cellules ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h dans des chambres d'incubation recouvertes d'un revêtement composé de collagène de type I et d'acide acétique. Les cellules ont ensuite été traitées avec la TPyP-arène-Ru (excitation : 405 nm ; émission : 650 nm) et la Zn-TPyP-arène-Ru (excitation : 561 nm ; émission : 655 nm). Les fluorescences des deux composés ont été analysées par microscopie confocale et l'internalisation cellulaire a été déterminée grâce au logiciel de traitement d'images Image J. Des images représentatives montrent les différentes conditions de traitement.

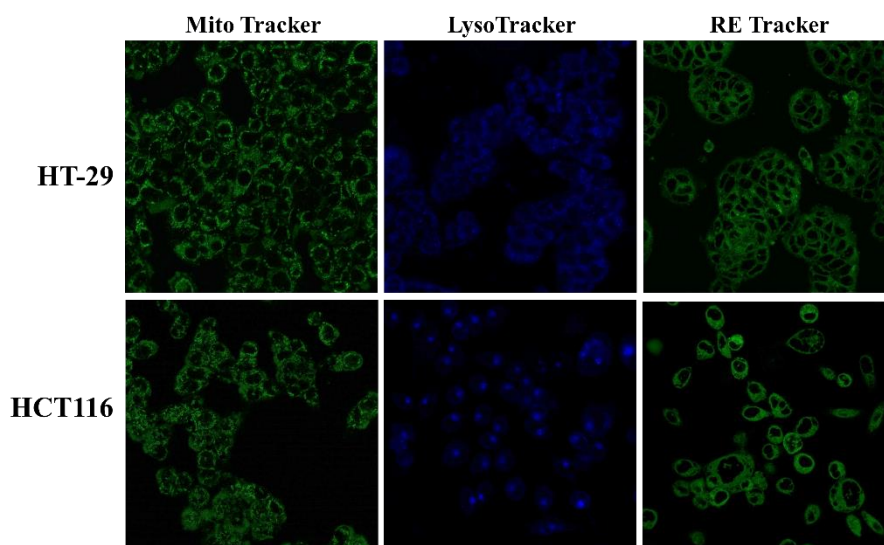


Figure 68 : Etude du marquage des organites cellulaires par microscopie confocale.

Les cellules ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h dans des chambres d'incubation recouvertes d'un revêtement composé de collagène de type I et d'acide acétique. Les cellules ont été traitées avec du Mito-Tracker (excitation : 490 nm ; émission : 516 nm), du Lyso-Tracker (excitation : 400 nm ; émission : 464 nm) et du RE-Tracker (excitation : 504 nm ; émission : 511 nm). Les fluorescences des Mito/Lyso/RE-Trackers ont été analysées par microscopie.

Malheureusement, les résultats préliminaires obtenus en microscopie confocale n'ont pas permis de montrer de co-localisation des composés avec la mitochondrie, les lysosomes ou le RE sur les deux lignées cellulaires (**Figure 69**).

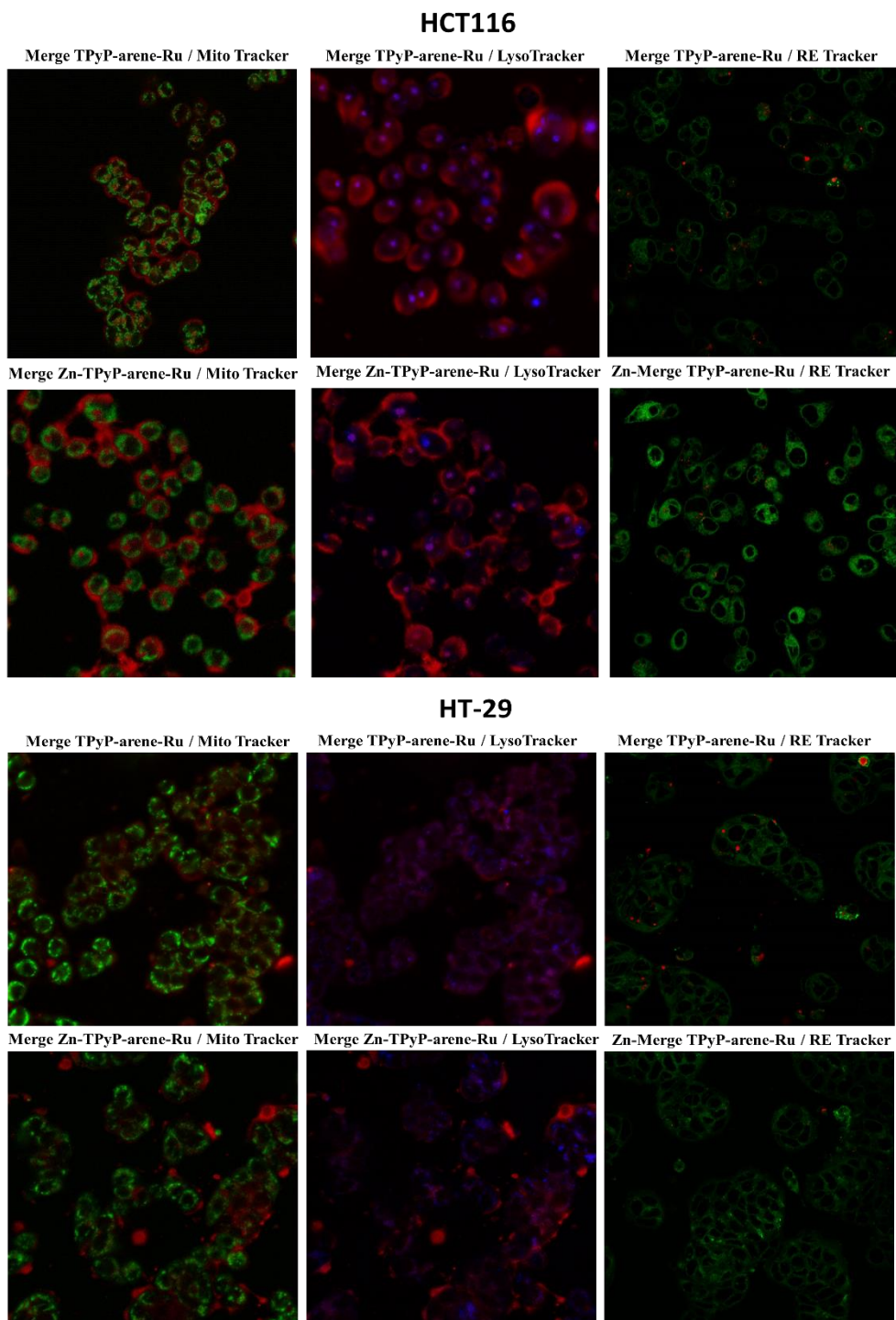


Figure 69 : Etude de la co-localisation cellulaire de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru par microscopie confocale.

Les cellules ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h dans des chambres d'incubation recouvertes d'un revêtement composé de collagène de type I et d'acide acétique. Les cellules ont ensuite été traitées avec la TPyP-arène-Ru (excitation : 405 nm ; émission : 650 nm) et la Zn-TPyP-arène-Ru (excitation : 561 nm ; émission : 655 nm) aux IC₅₀ déterminées. Les cellules ont été co-traitées avec du Mito-Tracker (excitation : 490 nm ; émission : 516 nm), du Lyso-Tracker (excitation : 400 nm ; émission : 464 nm) et du RE-Tracker (excitation : 504 nm ; émission : 511 nm). Les fluorescences des deux composés avec les Mito/Lyso/RE-Trackers ont été analysées par microscopie confocale et l'internalisation cellulaire a été déterminée grâce au logiciel de traitement d'images Image J. Des images représentatives montrent les différentes conditions de co-localisation.

I.4. Analyse du cycle cellulaire

La distribution des cellules au sein des différentes phases du cycle cellulaire a été analysée par cytométrie en flux en utilisant le marquage à l'IP. Les cellules HCT116 et HT-29 ont été ensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol et les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Des culots cellulaires pour chaque condition de traitement ont été collectés à 24 et 48h après la photoactivation. Juste avant l'analyse du contenu en d'ADN par cytométrie en flux, les cellules ont été marquées à l'IP. Ce dernier est un agent intercalant des acides nucléiques qui émet une fluorescence permettant d'analyser le contenu en ADN de chaque cellule et ainsi de connaître leur répartition dans le cycle cellulaire. En effet, les cellules dont le contenu en ADN est de 2N chromosomes sont en phase G1, celles entre 2N et 4N chromosomes sont en phase S alors que celles à 4N chromosomes sont en phase G2/M. Enfin, les cellules dont le contenu en ADN est altéré sont en phase sub-G1, caractéristique de l'apoptose. Les images d'analyse du cycle cellulaire présentées sont représentatives de trois expériences distinctes. Les résultats de l'analyse par cytométrie en flux sont représentés par des histogrammes qui affichent le pourcentage de cellules dans chaque phase du cycle cellulaire.

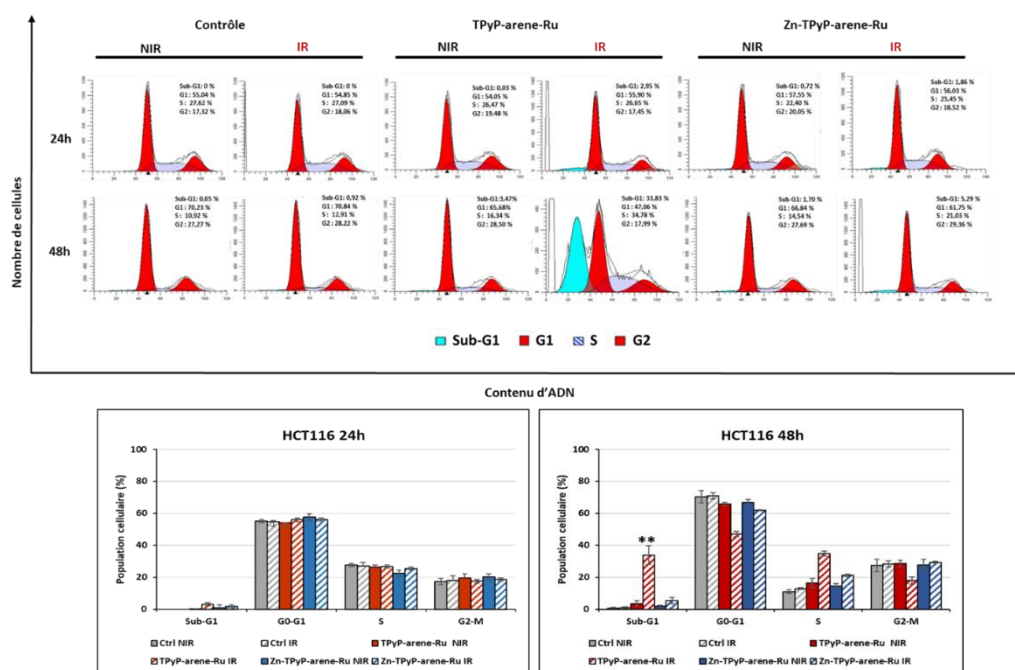


Figure 70 : Effets des deux composés et/ou de la PDT sur la répartition des cellules HCT116 dans les phases du cycle cellulaire.

Les cellules HCT116 ont été ensemencées et cultivées pendant 36h avant d'être exposées ou non à la TPyP-arène-Ru ou à la Zn-TPyP-arène-Ru. Après 24h d'incubation, les cellules ont été irradiées ou non. Ensuite, les cellules ont été collectées à 24 et 48h après la photoactivation. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux après marquage à l'IP. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (n = 3). ** p < 0,01. NIR : Non-irradié ; IR : irradié

Sur les cellules HCT116 (**Figure 70**), les résultats ont montré que la photoactivation de la TPyP-arène-Ru induisait principalement à 48h un pic sub-G1 de 33,83% vs 3,47%, 0,65% et 0,92% pour respectivement la TPyP-arène-Ru NIR et les contrôles NIR et IR. En revanche, nous avons observé que la Zn-TPyP-arène-Ru activée par la PDT a présenté un effet moindre en la comparant avec son analogue avec un pourcentage de 5,29% de cellules en sub-G1 vs 1,70% pour la Zn-TPyP-arène-Ru NIR à 48h post-irradiation.

Des résultats similaires ont été observés sur les cellules HT-29 (**Figure 71**). En effet, la TPyP-arène-Ru-PDT a induit un pic sub-G1 avec un pourcentage de 9,04% vs 1,66%, 1,22% et 1,51% pour respectivement la TPyP-arène-Ru NIR et les contrôles NIR et IR dès 24h après la photoactivation. Nous avons observé une augmentation significative à 48h du pourcentage de cellules en sub-G1 avec 28,30% pour la TPyP-arène-Ru-PDT vs 2,43%, 2,19% et 2,82% pour respectivement la TPyP-arène-Ru NIR et les contrôles NIR et IR. Un pic sub-G1 est également apparu pour la Zn-TPyP-arène-Ru-PDT par rapport à la Zn-TPyP-arène-Ru NIR (respectivement de 5,14% vs 1,09% à 24h et de 5,38% vs 1,87% à 48h post-irradiation).

Il est important de noter pour les lignées cellulaires HCT116 et HT-29 que les deux composés à l'obscurité n'ont aucune influence sur la répartition des cellules dans le cycle cellulaire à 24 et 48h après irradiation. En revanche, à 48h post-irradiation, la TPyP-arène-Ru-PDT induit une accumulation des cellules en phase S avec une diminution du nombre de cellules en phase G1 sur les deux lignées cellulaires.

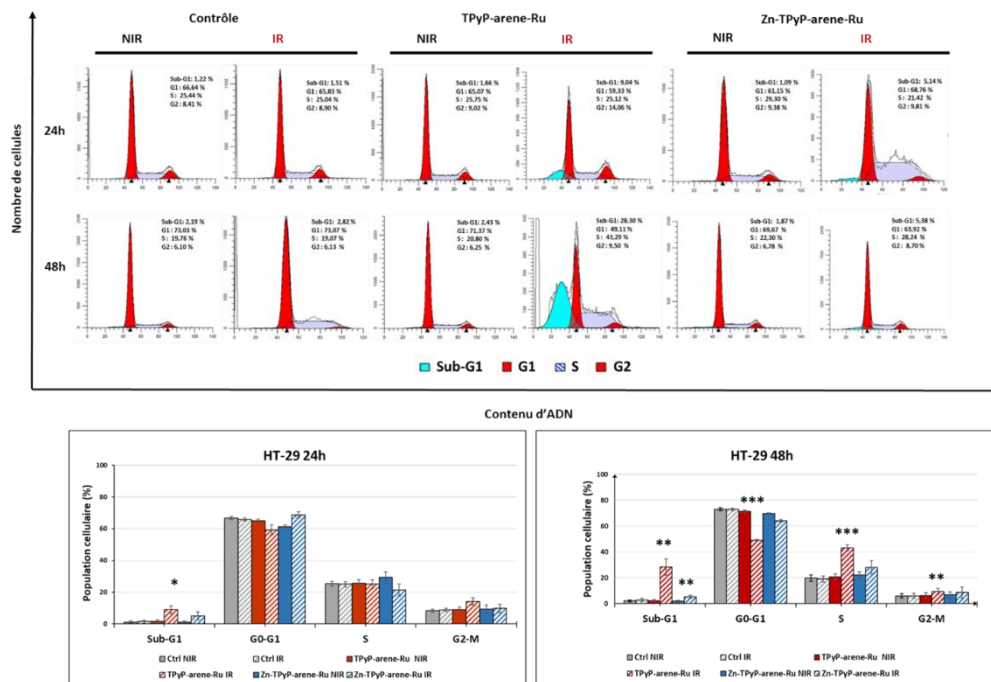


Figure 71 : Effets des deux composés et/ou de la PDT sur la répartition des cellules HT-29 dans les phases du cycle cellulaire.

Les cellules ont étéensemencées et cultivées pendant 36h avant d'être exposées ou non à la TPyP-arène-Ru ou à la Zn-TPyP-arène-Ru. Après 24h d'incubation, les cellules ont été irradiées ou non. Ensuite, les cellules ont été collectées à 24 et 48h après la photoactivation. Les cellules ont été analysées par cytométrie en flux après marquage à l'IP. Les données sont présentées sous forme de moyenne \pm SEM (n = 3). * p < 0,05 ; ** p < 0,01 et *** p < 0,001. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

I.5. Étude du niveau d'apoptose

L'analyse du cycle cellulaire des cellules HCT116 et HT-29 traitées par la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru couplées à la PDT a révélé l'apparition de pics sub-G1, traduisant la présence de cellules en apoptose. Suite à ces résultats, le mécanisme de mort cellulaire induit par la photoactivation de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru a été étudié sur les cellules HCT116 et HT-29 à 24 et 48h post-irradiation. Afin de vérifier la présence d'un processus apoptotique, un test de double marquage annexine-V-FITC/IP a été réalisé. Au cours des premiers stades de l'apoptose, les phosphatidylsérines sont connues pour leur translocation de la membrane plasmique interne à la membrane externe de la cellule. Ainsi, l'externalisation des phosphatidylsérines va permettre leur liaison avec l'annexine V-FITC. L'IP est utilisé afin de discriminer les cellules en phase précoce et en phase tardive de l'apoptose. En effet, l'IP 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. Par conséquent, les pourcentages de cellules apoptotiques aux stades précoce et tardif ont été déterminés par double marquage avec annexine V-FITC/IP en cytométrie en flux.

Les cellules HCT116 et HT-29 ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h. Les cellules ont ensuite été traitées ou non avec les TPyP-arène-Ru ou Zn-TPyP-arène-Ru aux IC_{50} déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol puis les cellules ont été irradiées ou non. A 24 et 48h post-irradiation, les cellules ont été marquées avec l'annexine V couplée au fluorochrome FITC et à l'IP, puis le pourcentage de cellules en apoptose a ensuite été déterminé pour chaque condition de traitement.

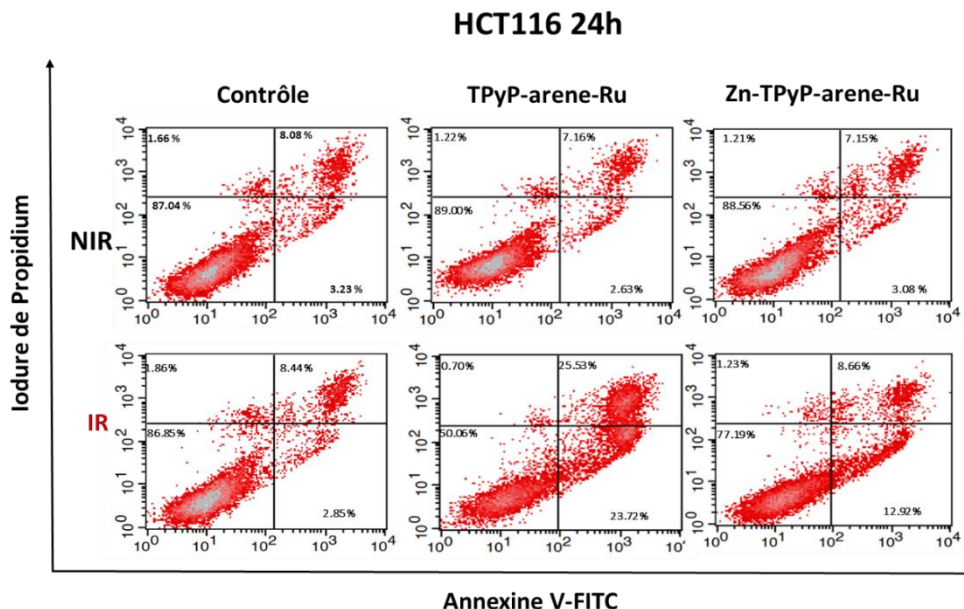


Figure 72 : Étude du niveau d'apoptose dans les cellules HCT116 à 24h.

Les cellules HCT116 ont étéensemencées et cultivées pendant 36h, traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC_{50} déterminées. Après 24h d'incubation, les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Les cellules ont été marquées à 24h après irradiation avec l'annexine V-FITC et l'IP puis le pourcentage de cellules en apoptose a été déterminé par cytométrie en flux. La population en bas à gauche représente les cellules vivantes (annexine V nég. / IP nég.), celle en bas à droite les cellules en apoptose précoce (annexine V pos. / IP nég.) 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. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

Les résultats ont montré que pour la lignée HCT116, les cellules contrôles (non traitées et non irradiées), le contrôle-lumière (cellules non traitées mais irradiées), la TPyP arène-Ru NIR et la Zn-TPyP-arène-Ru NIR induisaient peu d'apoptose, avec des taux cumulés d'apoptose précoce et tardive de 11,31%, 11,29%, 9,79% et 10,23% respectivement pour chaque condition à 24h post-irradiation. En revanche, nous avons remarqué que ce taux a fortement augmenté après irradiation pour atteindre 49,25% pour la TPyP-arène-Ru, plus efficace que la Zn-TPyP-arène-Ru-PDT avec 21,58% (**Figure 72**). De même, nous avons remarqué que la TPyP-arène-Ru-PDT et la Zn-TPyP-arène-Ru-PDT ont induit 61,46% et 42,41% de taux cumulé d'apoptose respectivement à 48h par rapport à 12,96% pour le contrôle ; 15,24% pour le contrôle-lumière ; 16,22% pour le TPyP-arène-Ru NIR et 22,14% pour le Zn-TPyP-arène-Ru NIR (**Figure 73**).

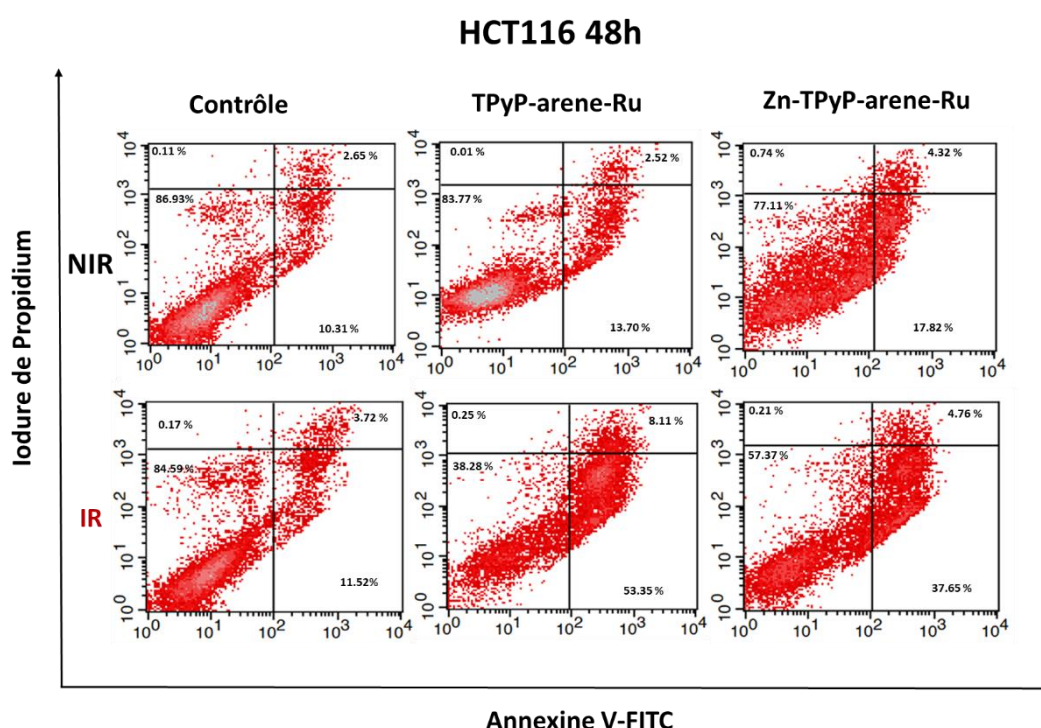


Figure 73 : Etude du niveau d'apoptose dans les cellules HCT116 à 48h.

Les cellules HCT116 ont étéensemencées et cultivées pendant 36h, traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Les cellules ont été marquées à 48h après irradiation avec l'annexine V-FITC et l'IP puis le pourcentage de cellules en apoptose a ensuite été déterminé par cytométrie en flux. La population en bas à gauche représente les cellules vivantes (annexine V nég. / IP nég.), celle en bas à droite les cellules en apoptose précoce (annexine V pos. / IP nég.) 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. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

En ce qui concerne la lignée cellulaire HT-29, les résultats similaires ont montré que le contrôle, le contrôle-lumière, la TPyP-arène-Ru NIR et la Zn-TPyP-arène-Ru NIR induisaient très peu d'apoptose, avec des pourcentages cumulés d'apoptose de 6,70%, 8,02%, 8,38% et 7,29% respectivement à 24h post-irradiation. Cependant, lorsque la TPyP-arène-Ru et la Zn-TPyP-arène-Ru ont été photoactivées, leurs taux cumulés d'apoptose précoce et tardive ont nettement augmenté pour atteindre 35,45% et 22,81% respectivement (**Figure 74**).

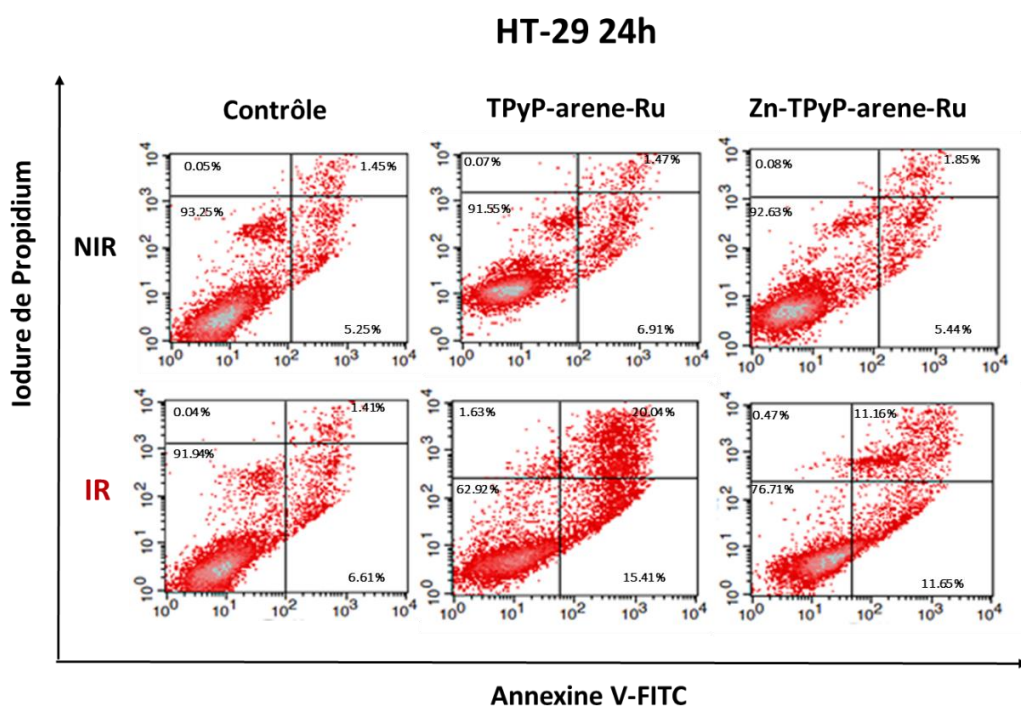


Figure 74 : Etude du niveau d'apoptose dans les cellules HT-29 à 24h.

Les cellules HT-29 ont étéensemencées et cultivées pendant 36h, traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC_{50} déterminées. Après 24h d'incubation, les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Les cellules ont été marquées à 24h après irradiation avec l'annexine V-FITC et l'IP puis le pourcentage de cellules en apoptose a ensuite été déterminé par cytométrie en flux. La population en bas à gauche représente les cellules vivantes (annexine V nég. / IP nég.), celle en bas à droite les cellules en apoptose précoce (annexine V pos. / IP nég.) 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. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

De plus, à 48h post-irradiation, la TPyP-arène-Ru et la Zn-TPyP-arène-Ru ont fortement induit de l'apoptose avec un taux cumulé de 58,31% et 36,87% respectivement. Par ailleurs, le contrôle, le contrôle-lumière, la TPyP-arène-Ru NIR et la Zn-TPyP-arène-Ru NIR ont montré peu d'apoptose avec respectivement 13,44%, 12,92%, 10,67% et 13,07% comme taux cumulé d'apoptose (**Figure 75**).

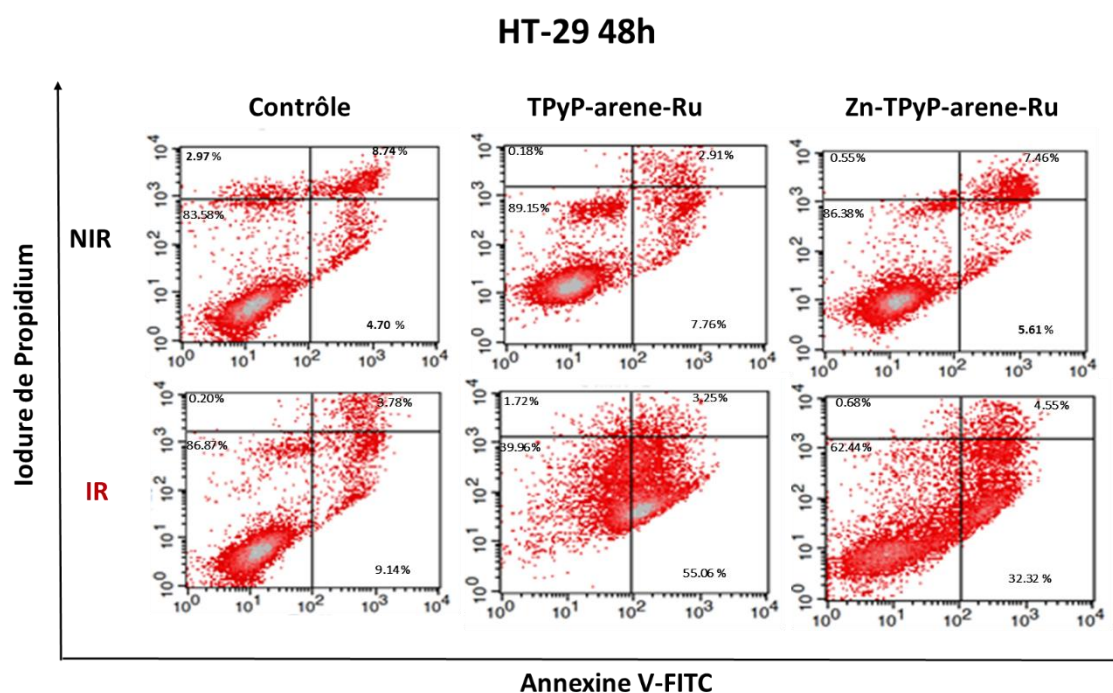


Figure 75 : Etude du niveau d'apoptose dans les cellules HT-29 à 48h

Les cellules HT-29 ont étéensemencées et cultivées pendant 36h, traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, les cellules ont ensuite été irradiées ou non. Les cellules ont été marquées à 48h après irradiation avec l'annexine V-FITC et l'IP puis le pourcentage de cellules en apoptose a ensuite été déterminé par cytométrie en flux. La population en bas à gauche représente les cellules vivantes (annexine V nég. / IP nég.), celle en bas à droite les cellules en apoptose précoce (annexine V pos. / IP nég.) 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. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

I.5.1. Analyse quantitative des caspases-3/-7 activées

L'analyse du processus apoptotique se poursuit par une étude des stades ultérieures de l'apoptose. Pour cela, l'analyse quantitative des caspases-3/-7 activées, qui sont des caspases effectrices conduisant au clivage de nombreux substrats cellulaires essentiels à la survie cellulaire, a été réalisée à l'aide du système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte® S3 pendant 48h.

Les cellules HCT116 et HT-29 ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h. Les cellules ont ensuite été traitées avec les TPyP-arène-Ru ou Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol et les cellules ont ensuite été irradiées, puis traitées avec le réactif vert caspases-3/-7 et placées dans le système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte® S3. Toutes les 6h pendant 48h après irradiation, des images des cellules ont été prises et la quantité de cellules exprimant une fluorescence verte a été quantifiée au cours du temps.

Pour la lignée HCT116 (**Figure 76**), les résultats ont montré que, la photoactivation de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru entraîne une importante augmentation de la quantité de caspases-3/-7 activées dès 6h de traitement. En effet, les deux composés ont engendré une

augmentation significative de cette activité au cours du temps de plus de 11 fois supérieure par rapport au contrôle-lumière à 48h post-irradiation (65,80% pour la TPyP-arène-Ru IR et 65,30% pour la Zn-TPyP-arène-Ru IR vs 5,82% pour le contrôle IR).

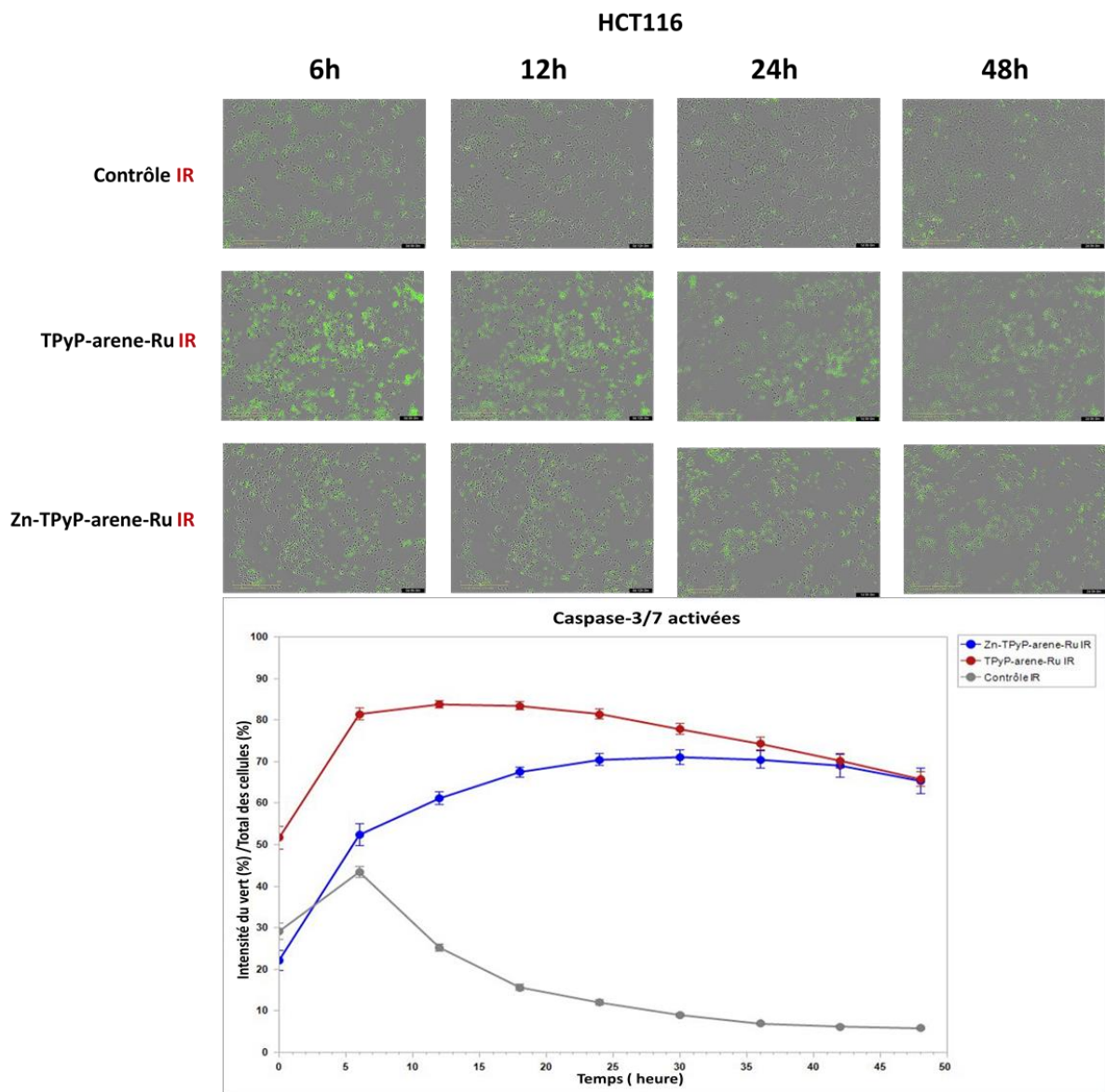


Figure 76 : Analyse quantitative des caspases-3/-7 activées dans les cellules HCT116 sur 48h

Les cellules HCT116 ont étéensemencées et cultivées pendant 36h puis traitées avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC_{50} déterminées. Les cellules ont ensuite été irradiées puis co-traitées avec le réactif vert caspase-3/-7 et placées dans le système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte® S3. Toutes les 6h, 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 à 6, 12, 24 et 48h post-irradiation. La quantité de cellules en apoptose a été quantifiée avec le logiciel IncuCyte® en utilisant le rapport du pourcentage de cellules fluorescentes en vert normalisé par le pourcentage de cellules totales dans chaque puits au cours du temps sur 48h. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

Des résultats similaires, mais légèrement plus faibles, ont été observés pour les cellules HT-29 (**Figure 77**). En effet, la photoactivation de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru a induit une augmentation modérée de la quantité de caspases-3/-7 activées visible dès 6h de traitement. Cette augmentation plus prononcée après 12h de traitement est de plus de 2 fois supérieure par rapport au contrôle-lumière (47,90% pour la TPyP-arène-Ru IR et 51,90% pour la Zn-TPyP-arène-Ru IR vs 22,44% pour le contrôle IR).

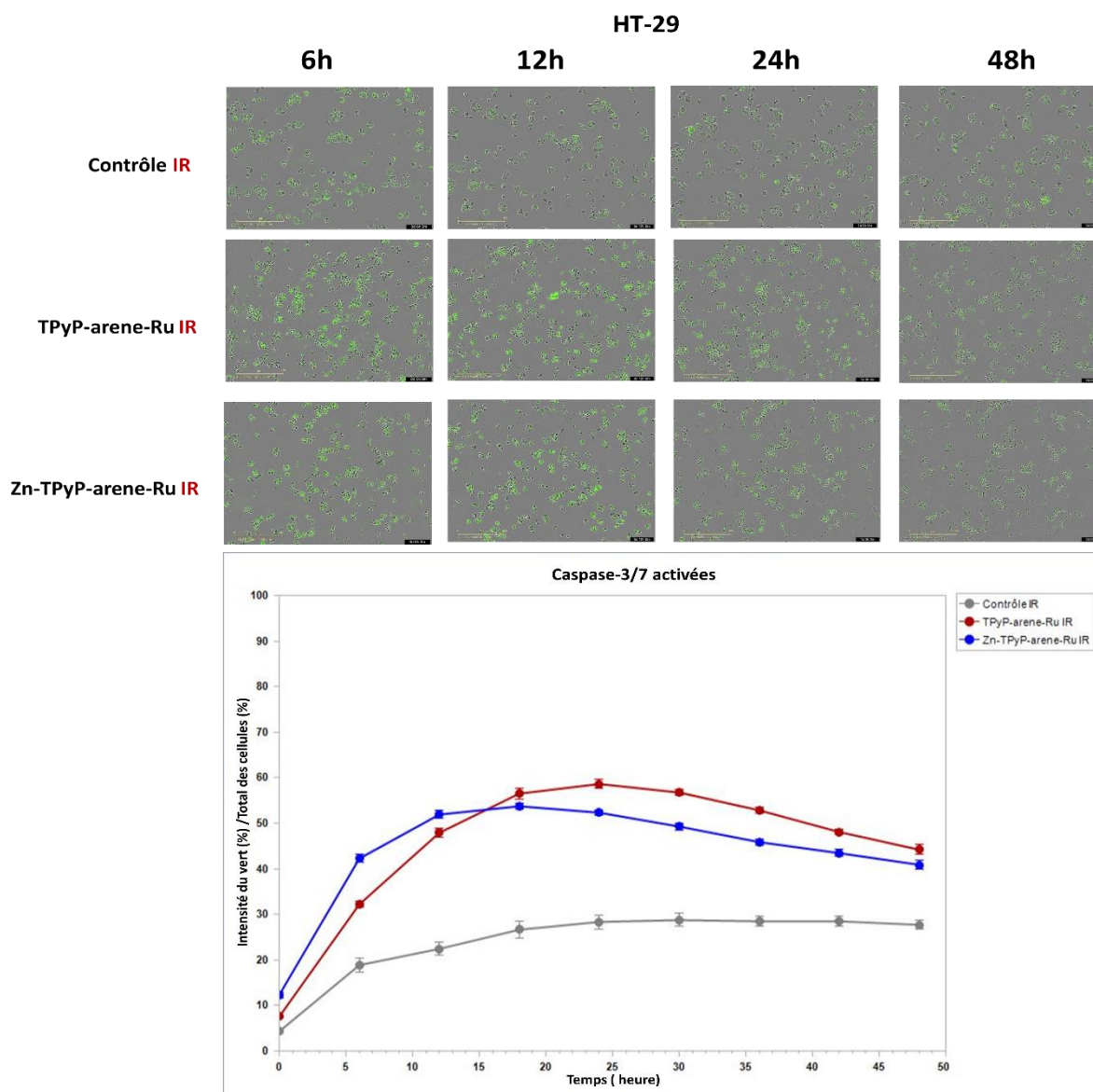


Figure 77 : Analyse quantitative des caspases-3/-7 activées dans les cellules HT-29 sur 48h

Les cellules HT-29 ont étéensemencées et cultivées pendant 36h puis traitées avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Les cellules ont ensuite été irradiées puis co-traitées avec le réactif vert caspases-3/-7 et placées dans le système d'analyse sur cellules vivantes IncuCyte® S3. Toutes les 6h, 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 à 6, 12, 24 et 48h post-irradiation. La quantité de cellules en apoptose a été quantifiée avec le logiciel IncuCyte® en utilisant le rapport du pourcentage de cellules fluorescentes en vert normalisé par le pourcentage de cellules totales dans chaque puits au cours du temps sur 48h. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

I.5.2. Expression protéique de marqueurs apoptotiques

L'exécution de l'apoptose a été analysée par l'étude de l'activité des caspases-3/-7. Les résultats ont montré une activité maximale dès 6h post-irradiation et que cette activité était maintenue jusqu'à 48h post-irradiation. L'activation de ces caspases effectrices a pour conséquence le clivage de plusieurs substrats cellulaires. L'un des substrats de la caspase-3 est la PARP, une enzyme responsable de la réparation de l'ADN. Pour cette raison, l'expression protéique de ces marqueurs apoptotiques a été analysée par Western blot (WB).

Les cellules HCT116 et HT-29 ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h puis traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol, puis les cellules ont été irradiées ou non. A 24 et 48h post-irradiation, les cellules ont été récupérées et l'expression des protéines a été déterminée par WB.

Sur les lignées cellulaires HCT116 et HT-29 (**Figures 78 à 81**), les résultats ont montré que les conditions TPyP-arène-Ru NIR, Zn-TPyP-arène-Ru NIR et le contrôle IR n'avaient aucun effet sur l'expression de la caspase-3 native à 24 et 48h post-irradiation. En revanche, nous avons principalement remarqué que la photoactivation de la TPyP-arène-Ru a entraîné une diminution de l'expression de la caspase-3 native (35 kDa), ce qui indiquerait son clivage, et par conséquent son activation. Cette diminution d'expression de la caspase-3 native a seulement été observée pour la Zn-TPyP-arène-Ru-PDT sur la lignée cellulaire HCT116.

Le fragment clivé de la caspase-3 (19 kDa) n'a pas pu être mis en évidence dans les deux lignées à 24 et 48h post-irradiation.

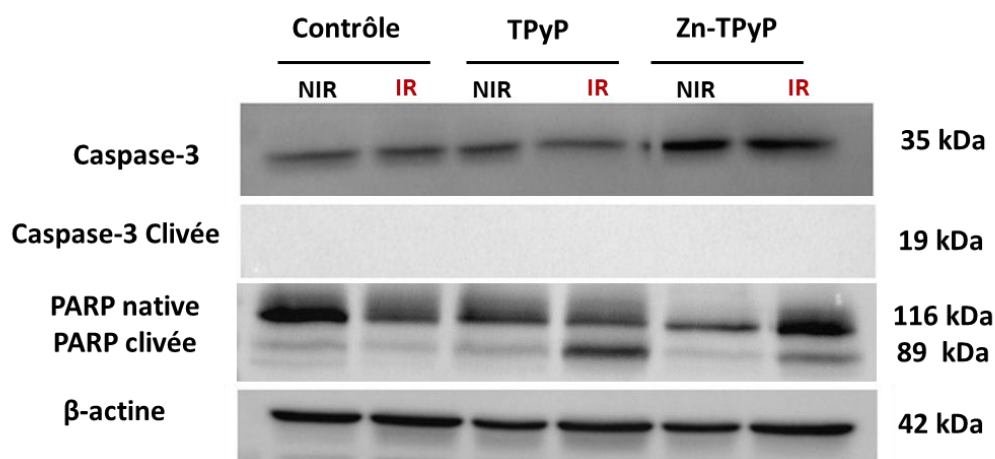


Figure 78 : Effets des composés et/ou de la PDT sur l'expression protéique de marqueurs apoptotiques dans les cellules HCT116 à 24h.

Les cellules HCT116 ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h puis traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol, puis les cellules ont été irradiées ou non. A 24h post-irradiation, les cellules ont ensuite été récupérées et l'expression des protéines a été déterminée par WB. La β-actine a été utilisée comme protéine de référence. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

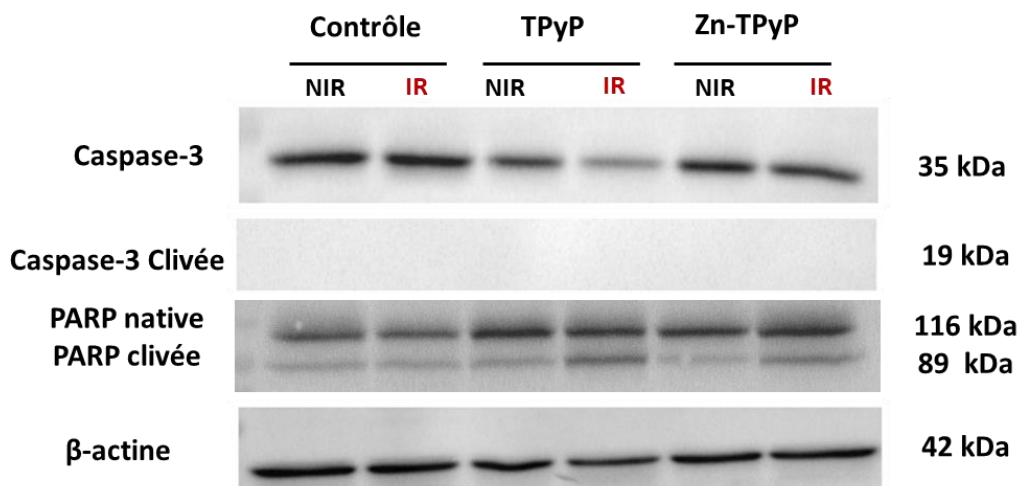


Figure 79 : Effets des composés et/ou de la PDT sur l'expression protéique de marqueurs apoptotiques dans les cellules HCT116 à 48h.

Les cellules HCT116 ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h puis traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC_{50} déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol, puis les cellules ont été irradiées ou non. A 48h post-irradiation, les cellules ont ensuite été récupérées et l'expression des protéines a été déterminée par WB. La β -actine a été utilisée comme protéine de référence. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

Pour rappel, le clivage de la pro-caspase-3 entraîne l'activation de cette dernière, qui pourra à son tour cliver la PARP native (116 kDa), la rendant inactive. Cette inactivation se traduit par la présence de sa forme clivée (89 kDa) observable par WB. Les résultats ont montré un clivage de la PARP à 24 et 48h post-irradiation pour la TPyP-arène-Ru IR et la Zn-TPyP-arène-Ru IR sur les deux lignées cellulaires HCT116 et HT-29. Le fragment clivé de la PARP est peu ou pas visible pour les conditions traitées non-irradiées ou les contrôles (**Figures 78 à 81**).

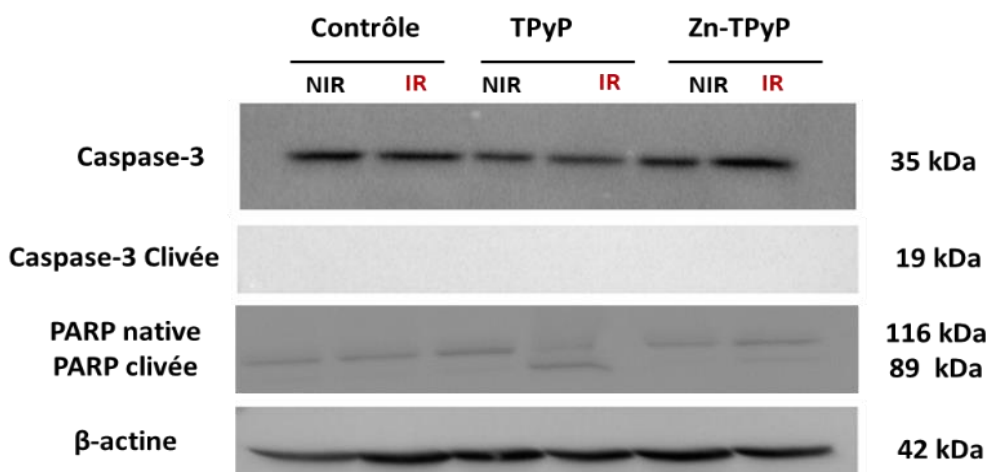


Figure 80 : Effets des composés et/ou de la PDT sur l'expression protéique de marqueurs apoptotiques dans les cellules HT-29 à 24h.

Les cellules HT-29 ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h puis traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC_{50} déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol, puis les cellules ont été irradiées ou non. A 24h post-irradiation, les cellules ont ensuite été récupérées et l'expression des protéines a été déterminée par WB. La β -actine a été utilisée comme protéine de référence. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

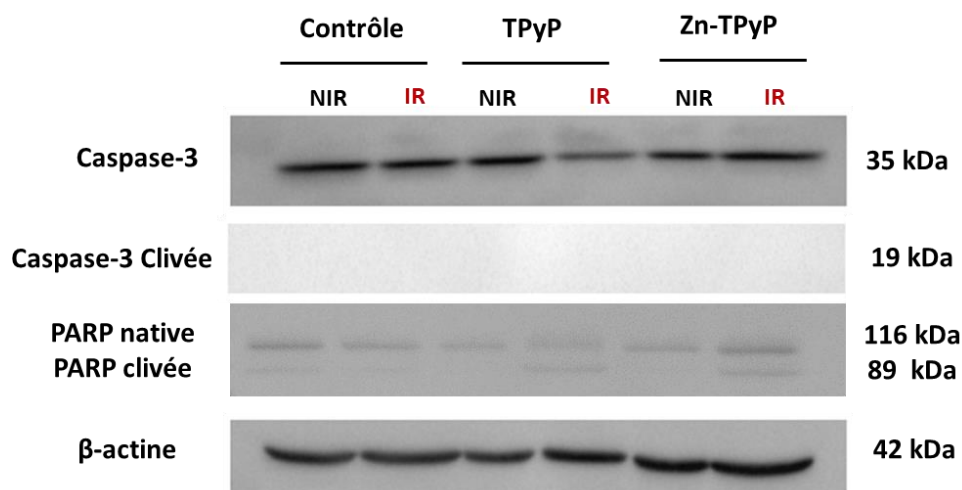


Figure 81 : Effets des composés et/ou de la PDT sur l'expression protéique de marqueurs apoptotiques dans les cellules HT-29 à 48h

Les cellules HT-29 ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h puis traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC_{50} déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol, puis les cellules ont été irradiées ou non. A 48h post-irradiation, les cellules ont ensuite été récupérées et l'expression des protéines a été déterminée par WB. La β -actine a été utilisée comme protéine de référence. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

Le contrôle et la régulation des événements apoptotiques passent généralement par l'intermédiaire des membres de la famille Bcl-2. En effet, le rapport entre le niveau des protéines pro- et anti-apoptotiques détermine la susceptibilité de la cellule à l'apoptose. Les protéines Bcl-2 ou Bcl-xL (anti-apoptotiques) et Bax, aux fonctions antagonistes, se lient et se neutralisent. L'excès de Bcl-2 détermine la survie, alors que l'excès de Bax favorise la mort cellulaire. Dans le but d'analyser les modifications survenues lors de la photoactivation de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru sur ces deux groupes de protéines, leur expression protéique a été étudiée.

Les cellules HCT116 et HT-29 ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h puis traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC_{50} déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu de culture dépourvu de rouge de phénol, puis les cellules ont été irradiées ou non. A 24 et 48h post-irradiation, les cellules ont ensuite été récupérées et l'expression des protéines a été déterminée par WB.

Les résultats obtenus sur les lignées cellulaires HCT116 et HT-29 ont montré qu'il n'y avait pas de variation notable de l'expression protéique de Bax et de Bcl-2, et ce quelles que soient les conditions de traitement et d'irradiation pour les deux temps analysés (**Figures 82 à 85**).

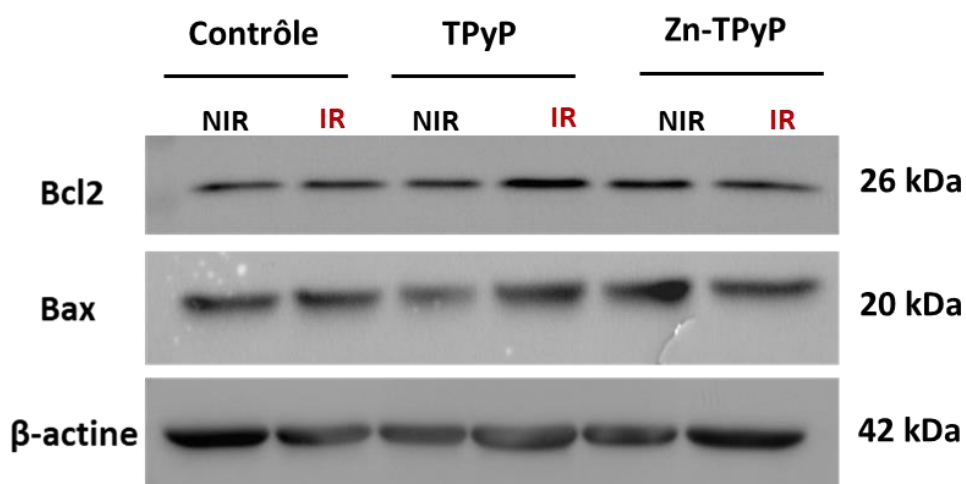


Figure 82 : Effets des composés et/ou de la PDT sur l'expression de protéines pro- et anti-apoptotiques dans les cellules HCT116 à 24h.

Les cellules HCT116 ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h puis traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol, puis les cellules ont été irradiées ou non. A 24h post-irradiation, les cellules ont ensuite été récupérées et l'expression des protéines a été déterminée par WB. La β -actine a été utilisée comme protéine de référence. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

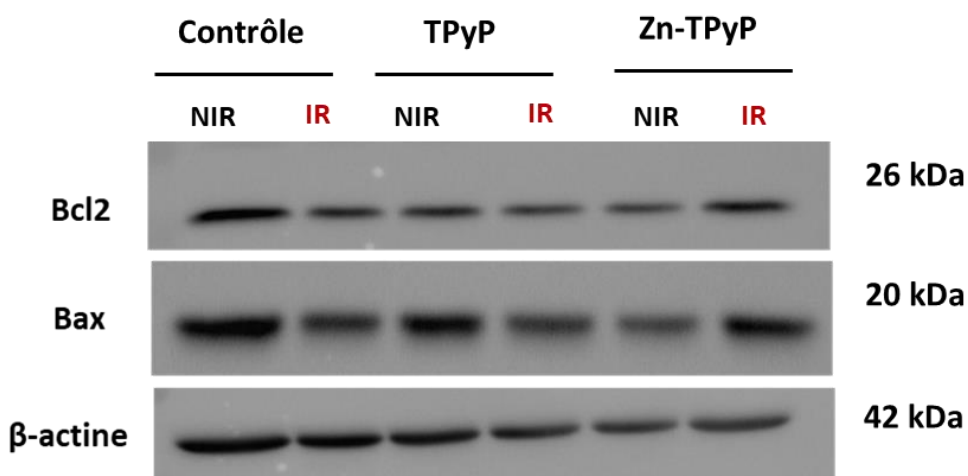


Figure 83 : Effets des composés et/ou de la PDT sur l'expression de protéines pro- et anti-apoptotiques dans les cellules HCT116 à 48h.

Les cellules HCT116 ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h puis traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol, puis les cellules ont été irradiées ou non. A 48h post-irradiation, les cellules ont ensuite été récupérées et l'expression des protéines a été déterminée par WB. La β -actine a été utilisée comme protéine de référence. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

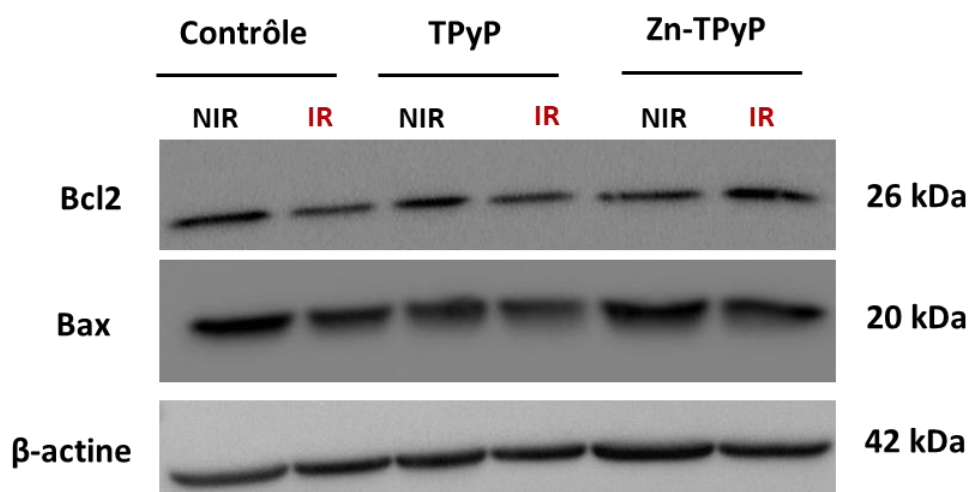


Figure 84 : Effets des composés et/ou de la PDT sur l'expression de protéines pro- et anti-apoptotiques dans les cellules HT-29 à 24h.

Les cellules HT-29 ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h puis traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol, puis les cellules ont été irradiées ou non. A 24h post-irradiation, les cellules ont ensuite été récupérées et l'expression des protéines a été déterminée par WB. La β-actine a été utilisée comme protéine de référence. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

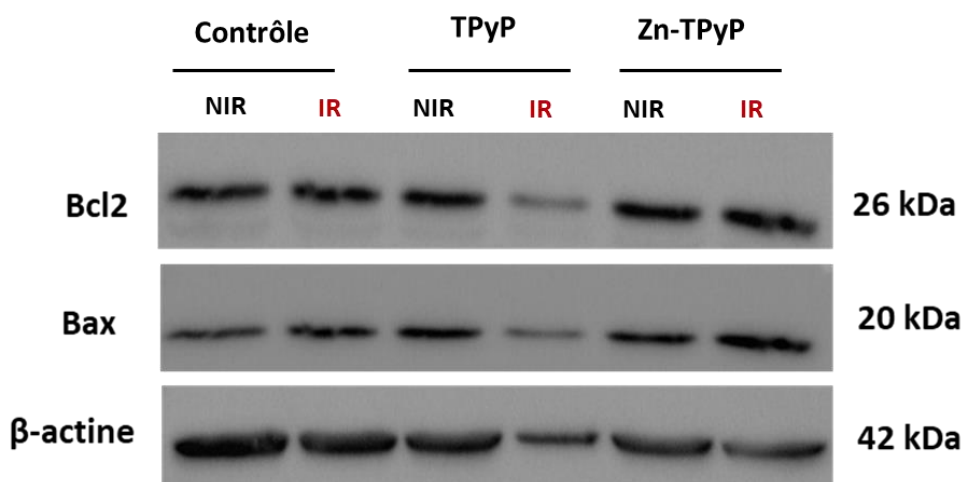


Figure 85 : Effets des composés et/ou de la PDT sur l'expression de protéines pro- et anti-apoptotiques dans les cellules HT-29 à 48h.

Les cellules HT-29 ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h puis traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol, puis les cellules ont été irradiées ou non. A 48h post-irradiation, les cellules ont ensuite été récupérées et l'expression des protéines a été déterminée par WB. La β-actine a été utilisée comme protéine de référence. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

I.5.3. Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN

Dans le but d'étudier les changements nucléaires tels que la formation de fragments oligonucléosomiques durant l'apoptose induite par la photoactivation de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru, le taux de fragmentation d'ADN a été déterminé par un test ELISA dans les deux lignées cellulaires à 24 et 48h post-irradiation afin de quantifier cette étape tardive de l'apoptose.

Les cellules HCT116 et HT-29 ont étéensemencées selon la densité déterminée et cultivées pendant 36h puis traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol puis les cellules ont été irradiées ou non. A 24 et 48h post-irradiation, les cellules ont ensuite été récupérées et la fragmentation de l'ADN a été quantifiée par un kit "Cell death detection enzyme linked immunosorbent assay^{PLUS}".

Les résultats ont indiqué que pour la lignée HCT116, la photoactivation de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru a entraîné une augmentation significative de la fragmentation de l'ADN, respectivement de 3,68 fois et de 2,36 fois par rapport au contrôle NIR à 24h post-irradiation. Il faut noter que l'irradiation seule et les conditions de traitement avec les composés seuls (NIR) n'ont pas d'effet sur la fragmentation d'ADN avec des valeurs proches du contrôle NIR (respectivement 1,41 ; 1,31 et 1,38 fold) (**Figure 86**).

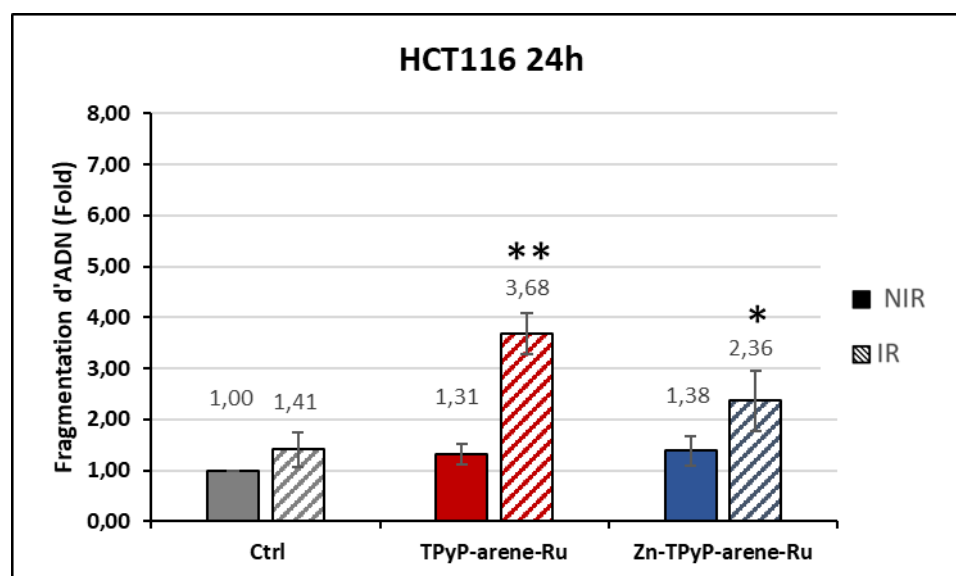


Figure 86 : Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN dans les cellules HCT116 à 24h

Les cellules HCT116 ont étéensemencées et cultivées pendant 36h puis traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol, puis les cellules ont été irradiées ou non. A 24h post-irradiation, 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 contrôle NIR est normalisée à 1 et celle des conditions traitées est exprimée en n-fold comparé à cette condition contrôle. Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm SEM avec $n \geq 3$. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

Ce taux de fragmentation de l'ADN a augmenté de manière significative à 48h post-irradiation, seulement pour la condition TPyP-arène-Ru-PDT en étant supérieur de 5,57 fois par rapport au contrôle NIR. De plus, le contrôle irradié et les conditions traitées avec les composés seuls (sans irradiation) n'ont pas d'effet sur la fragmentation de l'ADN avec respectivement des valeurs de 0,93 ; 0,82 et 0,70 fold par rapport au contrôle NIR (**Figure 87**).

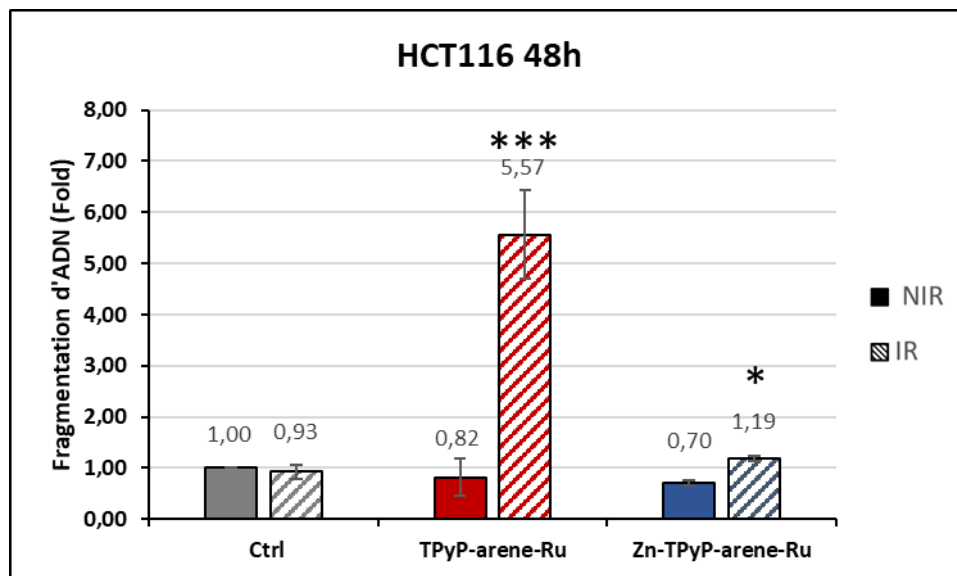


Figure 87 : Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN dans les cellules HCT116 à 48h

Les cellules HCT116 ont étéensemencées et cultivées pendant 36h puis traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC₅₀ déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu correspondant dépourvu de rouge de phénol, puis les cellules ont été irradiées ou non. A 48h post-irradiation, 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 contrôle NIR est normalisée à 1 et celle des conditions traitées est exprimée en n-fold comparé à cette condition contrôle. Les résultats sont exprimés comme la moyenne ± SEM avec n ≥ 3. * p < 0,05 et *** p < 0,001. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

Sur les cellules HT-29 (**Figure 88**), seule la TPyP-arène-Ru photoactivée a induit une augmentation significative de la fragmentation de l'ADN de 3,34 fois par rapport au contrôle NIR dès 24h après photoactivation, la Zn-TPyP-arène-Ru ne présentant une valeur que de 0,92 fold. Les conditions traitées non irradiées n'ont montré aucun effet sur la fragmentation de l'ADN, avec des valeurs de 0,75 fold pour la TPyP-arène-Ru et 0,84 fold pour la Zn-TPyP-arène-Ru, tout comme le contrôle-lumière à 0,95 fold par rapport au contrôle NIR.

A 48h post-irradiation, les résultats ont montré que la TPyP-arène-Ru-PDT et la Zn-TPyP-arène-Ru-PDT ont entraîné une augmentation significative de la fragmentation de l'ADN, respectivement de 5,41 fois et de 1,86 fois par rapport au contrôle NIR. En revanche, comme précédemment, le contrôle-lumière et les conditions traitées avec les composés mais non-irradiées n'ont pas induit de fragmentation de l'ADN (**Figure 89**).

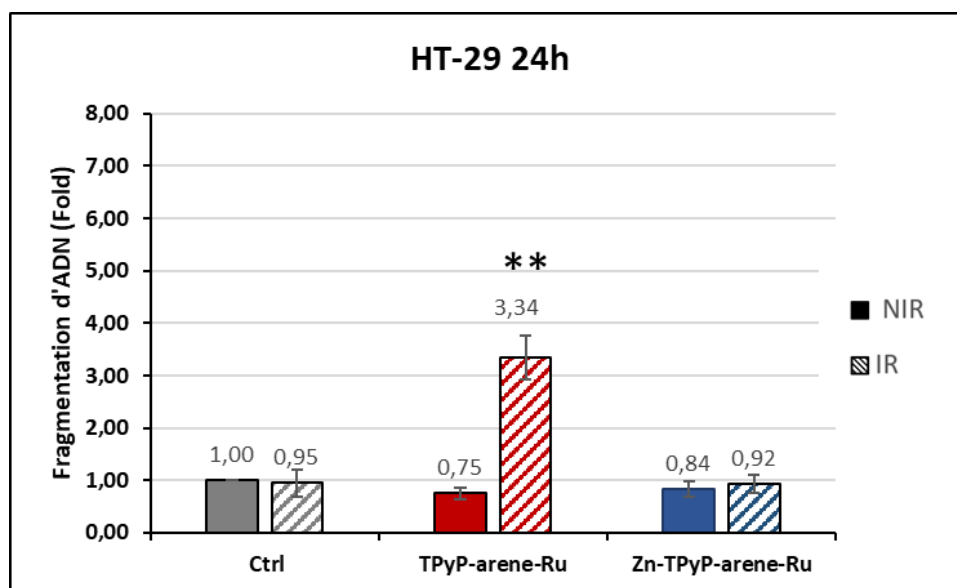


Figure 88 : Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN dans les cellules HT-29 à 24h.

Les cellules HT-29 ont étéensemencées et cultivées pendant 36h puis traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC_{50} déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu a été remplacé par du milieu de culture dépourvu de rouge de phénol, puis les cellules ont été irradiées ou non. A 24h post-irradiation, 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 contrôle NIR est normalisée à 1 et celle des conditions traitées est exprimée en n-fold comparé à cette condition contrôle. Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm SEM avec $n \geq 3$. ** $p < 0,01$. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

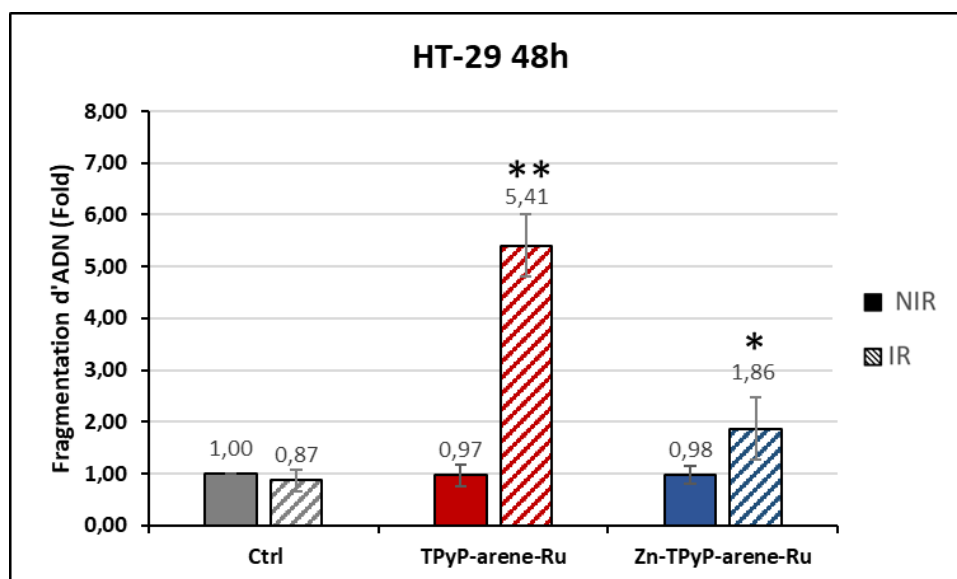


Figure 89 : Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN dans les cellules HT-29 à 48h.

Les cellules HT-29 ont étéensemencées et cultivées puis traitées ou non avec la TPyP-arène-Ru ou la Zn-TPyP-arène-Ru aux IC_{50} déterminées. Après 24h d'incubation, le milieu de culture a été remplacé par du milieu dépourvu de rouge de phénol, puis les cellules ont été irradiées ou non. A 48h post-irradiation, 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 contrôle NIR est normalisée à 1 et celle des conditions traitées est exprimée en n-fold comparé à cette condition contrôle. Les résultats sont exprimés comme la moyenne \pm SEM avec $n \geq 3$. * $p < 0,05$ et ** $p < 0,01$. NIR : Non-irradié ; IR : irradié.

Discussion

1- L'intérêt de la fonctionnalisation de la TPyP dans des cages d'arène-Ru

La PDT est une thérapie innovante contre le cancer qui offre des avantages par rapport aux traitements conventionnels. Néanmoins, malgré ses avantages potentiels, seul un petit nombre de PS sont approuvés comme les porphyrines. Ce type de PS présente une efficacité très réduite quand il est utilisé seul en raison de sa faible solubilité dans les milieux biologiques. En revanche, lorsqu'il est incorporé à des métaux, son internalisation cellulaire est améliorée et par conséquent son efficacité. Partant de cette théorie, la conjugaison de la porphyrine avec des métaux a suscité beaucoup d'intérêt [220].

Des études scientifiques récentes ont montré que les complexes de Ru ont montré leur fort potentiel en tant que plateformes anticancéreuses pour le développement de nouveaux médicaments à base de métaux, et notamment utilisés dans le traitement de plusieurs cancers tels que le cancer du côlon [181] [182]. La porphyrine et ses dérivés sont l'un des plus importants types de PS conjugués au Ru. Les propriétés intéressantes des complexes de Ru ont conduit à leur potentielle application dans divers domaines tels que des PS et des agents photoactifs de clivage de l'ADN à des fins thérapeutiques [194]. Récemment, la volonté de découvrir des approches alternatives pour améliorer la spécificité et la sélectivité de la distribution de médicaments aux cellules cancéreuses a fait l'objet d'une grande attention [188]. Pour surmonter les problèmes de solubilité et de stabilité des PS à base de Ru, les assemblages métalliques ont commencé à susciter un intérêt considérable, en tant que systèmes d'encapsulation de PS [200] [202].

Plusieurs études ont rapporté que les complexes porphyrine-Ru avaient des effets anticancéreux significatifs. *Bogoeva et al.* ont rapporté des photo-lésions induits par la porphyrine-Ru dans les cellules cancéreuses de la vessie [221]. De plus, *Schmitt et al.* ont démontré que cinq dérivés d'arène Ru (II) 5,10,15,20-tétra(4-pyridyl)porphyrine (TPP), ainsi qu'un *p*-cyménosmium et deux pentaméthylcyclopentadiényliridium présentaient d'excellentes phototoxicités envers les cellules de mélanome lorsqu'ils étaient exposés à une lumière laser de 652 nm [222]. Des études d'absorption cellulaire et de microscopie de localisation de $[\text{Ru}_4-(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{CH}_3)_4(\text{TPP})\text{Cl}_8]$ et $[\text{Rh}_4-(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)_4(\text{TPP})\text{Cl}_8]$ ont révélé qu'ils s'accumulaient dans le cytoplasme des cellules de mélanome dans des structures granulaires différentes des lysosomes

Une autre étude menée par *Rani-Beeram et al.* a établi que la porphyrine-Ru fluorée présentait une forte interaction avec l'ADN qui a conduit à son clivage dans les cellules de mélanome [223]. Plus récemment, nous avons rapporté qu'une cage cubique ou prismatique pouvait servir de support idéal pour les PS dans le traitement de la polyarthrite rhumatoïde [224]. De plus, nous avons démontré dans une autre étude que la combinaison de complexes de tétrapyridylporphyrine et d'arène Ru (II) jouait un rôle crucial en tant qu'agent anticancéreux conjugué à la PDT pour le traitement du sarcome synovial [217].

Dans notre projet, nous sommes les premiers à utiliser des cages métalliques cubiques TPyP-arène-Ru et Zn-TPyP-arène-Ru pour traiter le CCR. Nous voulions démontrer le potentiel de ces cages en tant que système d'encapsulation de la TPyP. Dans ce but, nous avons évalué l'effet du complexe TPyP-arène-Ru associé à la PDT sur deux lignées cellulaires humaines de CRC, HCT116 et HT-29. Comme nous l'avons expliqué précédemment, nos cages contiennent un

métal-ligand et pour évaluer l'effet du métal sur notre PS, le métal diamagnétique (Zn^{2+}) a été introduit au centre de l'anneau de tétrapyrrole dans les panels TPyP (Zn-TPyP).

Tout d'abord, nous avons évalué la photocytotoxicité de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru, et nous avons démontré que les deux structures ont présenté un effet cytotoxique significatif avec des valeurs d' IC_{50} intéressantes (ordre du nanomolaire) sur les deux lignées cellulaires étudiées. Ce résultat était attendu en raison de la structure distincte de ces cages contenant deux unités de TPyP comme PS, ce qui a pour effet de renforcer l'efficacité du traitement et nous permet par conséquent de réduire la dose nécessaire pour obtenir un meilleur effet thérapeutique. La TPyP-arène-Ru s'est avérée induire une cytotoxicité remarquable de 5 à 8 fois supérieure par rapport à son analogue la Zn-TPyP-arène-Ru sur les deux lignées cellulaires. Nous pouvons relier cela à la fluorescence plus élevée du PS avec un centre métallique. En effet, lorsque ce PS est irradié, il est excité et donc absorbe une partie de l'énergie d'irradiation et va atteindre un état d'énergie plus élevé (état singulet excité). La fluorescence est une conséquence de la décroissance énergétique de l'état excité du PS vers l'état d'énergie minimale. Par conséquent, un rendement quantique de fluorescence (Φ_F) élevé suggère qu'une grande partie de l'énergie de l'état excité singulet du PS retourne à l'état fondamental sans passer par l'état excité triplet. Ainsi, il génère plus de fluorescence mais laisse derrière lui moins d'énergie dans l'état triplet pour interagir avec l' O_2 présent dans l'environnement, et donc il donne naissance à une quantité moindre d'ERO conduisant à la mort cellulaire ce qui diminue l'efficacité du traitement. Deuxièmement, nous avons démontré que les cages métalliques testées n'ont aucun effet cytotoxique à l'obscurité même avec des concentrations élevées. Ces résultats peuvent confirmer que ces deux complexes peuvent être des PS idéaux pour la PDT et que ces cages peuvent donner lieu à des différences significatives dans les effets de la PDT.

Dans nos travaux de recherche, la comparaison de l'efficacité anticancéreuse des complexes TPyP-arène-Ru et Zn-TPyP-arène-Ru par rapport aux analogues libres de TPyP (TPyP et Zn-TPyP) n'a pas été étudiée. En effet, comme nous l'avons déjà expliqué, la porphyrine possède une forte hydrophobicité dans les milieux physiologiques formant des agrégats ce qui limite fortement leur biodistribution par conséquent leur utilisation [225] [226]. En revanche, des études ont montré que des assemblages métalliques cubiques similaires avec la TPyP inhibaient efficacement le chevauchement intramoléculaire des blocs de porphyrine [227]. De même, comme ces structures d'encapsulation sont des assemblages cationiques, la répulsion électronique entre ces assemblages devrait éviter la formation d'agrégats. Cette caractéristique pourrait influencer positivement l'efficacité de la PDT, par donc améliorer l'index thérapeutique.

Les résultats obtenus dans notre étude ont montré une inhibition significative de la prolifération cellulaire induite par la photoactivation de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru. Cet effet peut être la conséquence d'une biodistribution améliorée de deux PS. De même, les complexes de Ru étant connus pour leur affinité pour les cellules cancéreuses, l'effet cytotoxique significatif peut être expliqué par une meilleure internalisation cellulaire et une forte accumulation des deux complexes à l'intérieur des cellules cancéreuses. Cette accumulation intracellulaire a été mise en évidence grâce à la fluorescence naturelle des PS par deux techniques d'analyse d'images (Amnis et microscopie confocale). En effet, les deux complexes ont une fluorescence naturelle dans le rouge ce qui a permis de mettre en évidence

la présence intracellulaire des deux PS. Du fait que les spectres de fluorescence des deux PS soient dans le rouge, nos deux complexes répondent fortement aux caractéristiques des PS idéaux pouvant traiter des tumeurs profondes. L'ensemble de ces premiers résultats permet d'affirmer que la TPyP-arène-Ru et la Zn-TPyP-arène-Ru répondent aux critères clés d'un PS idéal : une stabilité et une solubilité constante, une dose minimale pour une grande efficacité thérapeutique, aucune toxicité à l'obscurité, une amélioration de la sélectivité tumorale permise grâce à l'affinité du Ru aux sites de liaison de la transferrine hautement présents dans les cellules tumorales, une absorption dans le rouge indispensable au traitement de tumeurs profondes.

Synthétisées comme de potentiels agents anticancéreux, la TPyP-arène-Ru et la Zn-TPyP-arène-Ru photoactivées par la lumière rouge induisent une inhibition de la prolifération cellulaire. L'inhibition de la prolifération des cellules cancéreuses par des médicaments cytotoxiques pourrait résulter de l'induction de l'apoptose ou de l'arrêt du cycle cellulaire ou d'une combinaison des deux processus [228]. Pour cette raison, la suite de cette étude s'est focalisée sur les mécanismes à l'origine de cette inhibition afin de vérifier si celle-ci est la conséquence d'un arrêt du cycle cellulaire et/ou de l'induction d'un processus apoptotique.

2- Mécanismes de mort cellulaire induite par la PDT

Dans le cadre de la PDT, l'effet des PS sur le cycle cellulaire est très peu étudié, laissant la préférence pour l'étude de l'induction du processus apoptotique.

Nous avons étudié le mécanisme possible d'inhibition de la croissance cellulaire par l'analyse de la répartition des cellules dans les différentes phases du cycle cellulaire en cytométrie en flux. Nous avons démontré que la TPyP-arène-Ru et la Zn-TPyP-arène-Ru couplés à la PDT entraînaient une augmentation marquée de la proportion de cellules apoptotiques, comme le reflètent les pics sub-G1. En revanche, seule la TPyP-arène-Ru à 48h post-irradiation a montré une accumulation des cellules en phase S alors que la Zn-TPyP-arène-Ru-PDT n'a montré aucun effet significatif sur la distribution du cycle cellulaire [229]. Les résultats sont en accord avec une étude menée par *Li et al.* qui a démontré que sur plusieurs complexes de Ru testés la majorité induisait l'apoptose des cellules A549 du carcinome de poumon caractérisée par un pic sub-G1 [230].

La régulation du cycle cellulaire implique également une surveillance étroite de l'intégrité de la cellule et de ses constituants. Lorsqu'une lésion de l'ADN se produit, le cycle est arrêté à des points de contrôle spécifiques, appelés checkpoints, pour permettre la réparation des dommages. Après réparation, la cellule poursuit son cycle cellulaire ou, si les lésions sont trop importantes pour être réparées, la cellule entre en apoptose [231].

L'apoptose implique la destruction programmée des cellules et l'internalisation des composants cellulaires dans des corps apoptotiques qui seront ensuite phagocytés. Le processus apoptotique se caractérise morphologiquement par un rétrécissement cellulaire et des changements intracellulaires spécifiques tels que la condensation de la chromatine, la fragmentation nucléaire ou l'internalisation de différentes parties de la cellule dans des corps apoptotiques [232].

Dans le contexte de la PDT, la voie apoptotique empruntée est dépendante de la localisation du PS au sein de la cellule. Le principe de la PDT repose sur la génération des ERO suite à la photoactivation du PS. En effet, selon l'intensité du stress oxydatif généré, les lésions produites peuvent aboutir à la mort cellulaire tout en dépendant du rendement, de la durée de vie et du site de production des ERO [140]. Par ailleurs, il a été démontré que lorsque ces ERO sont générées au niveau des mitochondries ou du cytoplasme, elles permettent l'induction de l'apoptose [233]. A ce niveau, les ERO induisent l'ouverture des pores dans la membrane mitochondriale conduisant par la suite à l'activation des caspases engendrant la mort cellulaire par apoptose.

Au cours des premiers stades de l'apoptose, les phosphatidylsérines se transloquent de la membrane plasmique interne de la cellule vers la membrane externe. Afin d'évaluer l'induction du mécanisme apoptotique conduisant à la mort cellulaire, nous avons montré l'externalisation des phosphatidylsérines des cellules apoptotiques (apoptose précoce) sur les cellules HCT116 et HT-29. Nous avons établi que la photoactivation de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru augmentait considérablement le taux cumulé d'apoptose précoce et tardive. Ces résultats sont en accord avec une étude de *Silva et al.* rapportant la mort cellulaire par apoptose des cellules HCT116 du carcinome du colon humain traitées avec le complexe Ru(II)-thymine *in vitro* mais également *in vivo* par la réduction de la croissance tumorale des cellules HCT116 après traitement dans un modèle de xénogreffe [234]. De même, *Li et al.* ont démontré l'induction de l'apoptose dans les cellules HepG2 du cancer du foie après la photoactivation du complexe de porphyrine de Ru Rup-03 [235]. De plus, une étude menée par *Pan et al.* a rapporté l'induction de l'apoptose par un complexe de Ru polypyridine (Ru3) conjugué à un dérivé du 5-FU comme ligand sur les cellules du cancer du col de l'utérus HeLa [236].

L'analyse du processus apoptotique confirme sa mise en place. De ce fait, une étude des stades ultérieures de l'apoptose a été réalisée. En effet, les protéases de la famille des caspases sont très généralement activées au cours de l'apoptose. La famille des caspases renferme les caspases initiateuses qui une fois activées, activent à leur tour les caspases effectrices représentées principalement par les caspases-3 et -7. Cette activation aura lieu pendant la phase exécutive de l'apoptose aboutissant au clivage de nombreux substrats cellulaires dont la protéine PARP impliquée dans la réparation de l'ADN. Le clivage de la PARP aboutit à son inactivation, l'empêchant alors de réparer l'ADN en cas de fragmentation. De plus, la caspase-3 active également en fin d'apoptose des endonucléases qui vont cliver l'ADN en fragments oligonucléosomiques. Cette fragmentation de l'ADN est caractéristique des cellules apoptotiques et la mesure de la génération des fragments oligonucléosomiques permet d'apprécier le pouvoir pro-apoptotique des PS. Dans cette étude, les résultats ont révélé que la photoactivation de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru par la lumière rouge induit l'activation des caspases-3/-7 dès 6h post-irradiation. De même, nous avons démontré que dès 24h après irradiation l'activation de la caspase-3 a induit le clivage de la PARP. Ce résultat peut être lié aux propriétés photophysiques et photochimiques des complexes de Ru qui leur permettent de se lier à l'ADN et d'induire son clivage par photoactivation [179].

Ces résultats sont en accord avec l'étude de *Lu et al.* qui a rapporté l'effet anticancéreux des complexes de Ru sur le carcinome hépatocellulaire en montrant l'inhibition de la croissance

cellulaire des cellules HCC testées, l'induction de l'apoptose reflétée par le pic sub-G1, l'activation des caspases et la fragmentation de l'ADN [237].

En effet, *Peña et al.* ont démontré l'induction de l'apoptose par l'activation des caspases-3/-7 après la photoactivation des composés de ruthénium(II)-polypyridyle avec des ligands d'azote sur des cellules d'adénocarcinome pulmonaire humain [238].

De même, une autre étude menée par *Bomfim et al.* a montré que les complexes de Ru(II) avec le 6-méthyl-2-thiouracile induisaient une réduction de la prolifération cellulaire, l'externalisation des phosphatidylsérines, une activation des caspases-3, -8 et -9 et la chute du potentiel transmembranaire mitochondrial dans les cellules HL-60 de la leucémie myéloïde [239].

D'autre part, la régulation du processus apoptotique via les mitochondries est médiée par les membres de la famille Bcl-2. En effet, le ratio entre des protéines pro- et anti-apoptotiques détermine la susceptibilité de la cellule à l'apoptose. Les protéines Bcl-2 (ou Bcl-xL) et Bax, aux fonctions antagonistes, se lient et se neutralisent entre elles. En effet, la protéine Bcl-2 empêche l'homodimérisation de Bax, de Bak et de certaines autres protéines pro-apoptotiques multi-domaines de la même famille. L'homodimère de Bax se fixe à la membrane externe mitochondriale. Cette fixation entraîne une perforation de la membrane mitochondriale et un relargage de cytochrome c dans le cytosol qui active la caspase-3, entraînant la mort cellulaire. Dans le but d'analyser les modifications survenues par la photoactivation de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru sur ces deux groupes de protéines, leur expression protéique a été étudiée par WB. Les résultats obtenus n'ont révélé aucune variation d'expression de Bax ni de Bcl-2 après photoactivation par rapport aux cellules contrôles, par extrapolation les traitements n'auraient ici pas d'effet sur le rapport Bax/Bcl-2.

Néanmoins, plusieurs auteurs ont montré la surexpression de Bax avec une diminution de l'expression de Bcl-2. En effet, *Li et al.* a démontré que sur un groupe de complexes de Ru testés, une surexpression de Bax était corrélée avec une diminution de l'expression de Bcl-2 sur les cellules A549 du carcinome de poumon humain [230]. De même, une étude réalisée par *Jiang et al.* a montré que les complexes de Ru diminuaient l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL mais augmentaient l'expression des protéines pro-apoptotiques Bad, Bax et Bid [240].

L'ensemble de ces résultats permettent de démontrer que l'inhibition de la prolifération cellulaire est consécutive à la photoactivation de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru avec la lumière rouge, ce qui a généré une production d'ERO conduisant à la mort cellulaire via le processus apoptotique dans les deux lignées du CCR étudiées HCT116 et HT-29.

Conclusion et perspective

Le CCR est l'une des tumeurs malignes les plus fréquentes, qui se caractérise par une mortalité élevée, des métastases rapides et des récives conduisant à la mort du patient. En effet, les dernières statistiques ont révélé que le CCR est le troisième cancer le plus diagnostiqué et la deuxième cause mondiale de décès par cancer. Les recherches estiment qu'il sera à l'origine de 1,1 millions de décès par an d'ici à 2030 [241]. Les différentes stratégies de traitement du CCR ont été améliorées ces dernières années. Cependant, en raison des récives tumorales et de l'échec des traitements aux stades métastatiques, les taux de survie des patients atteints de CCR à un stade avancé restent faibles. De plus, bien que les traitements anticancéreux actuels soient souvent efficaces, le développement d'une résistance à ces médicaments ainsi que leurs graves effets secondaires sont des obstacles majeurs à la réussite du traitement du CCR.

La PDT est une approche non invasive et hautement sélective pour le traitement du cancer, notamment du CCR. Le mécanisme moléculaire de la PDT implique la photoactivation d'un PS par une longueur d'onde de lumière appropriée en présence de molécules d'oxygène dans l'environnement tumoral. La PDT, par l'utilisation de PS non cytotoxiques en l'absence de leur photoactivation, contrairement à la chimiothérapie, ainsi que par leur activation ciblée, permet de limiter les effets secondaires indésirables. En effet, le principe de la PDT repose sur sa capacité à utiliser la puissance de la lumière pour endommager directement les tissus tumoraux. La PDT vise principalement la génération d'ERO qui sont impliquées dans la toxicité cellulaire. Actuellement, les PS les plus utilisés en PDT sont les dérivés du tétrapyrrole tels que les porphyrines, les chlorines, les bactériochlorines et les phtalocyanines. Néanmoins, les principaux inconvénients de ces PS sont leur faible solubilité et leur faible sélectivité tumorale, limitant ainsi leur utilisation dans les essais cliniques [242].

En effet, la conjugaison des porphyrines aux complexes de Ru a été une stratégie intéressante pour le développement des composés anti-cancéreux. Cette approche vise à combiner la cytotoxicité de la partie métallique du Ru en tant qu'agent de clivage d'ADN, avec la phototoxicité du chromophore de la porphyrine pour des effets antitumoraux additifs. Pour contourner le problème de la solubilité et de la stabilité des PS à base de Ru, des assemblages métalliques ont été créés. Ces assemblages moléculaires en tant que système d'encapsulation génèrent un environnement isolé pour le PS dans le but de le protéger puisqu'étant souvent une molécule sensible ou instable.

Nos collaborateurs *Gallardo-Villagrán et al.* ont signalé par plusieurs études que la faible solubilité de certains PS pouvait être résolue par l'utilisation de ces métallacages à base d'arène-Ru. De plus, ils ont démontré que la combinaison de complexes de TPyP et d'arène Ru (II) jouait un rôle crucial en tant qu'agent anticancéreux conjugué à la PDT pour le traitement du sarcome synovial [218]. En effet, ils ont rapporté l'efficacité de ces assemblages métalliques en tant que transporteurs de PS selon deux différentes formes, prismatique et cubique [205]. La première forme accueille le PS en tant qu'invité dans sa cavité interne, le transporte et le libère dans les cellules cibles [207]. La deuxième forme de ce système de vectorisation réfère aux métallacages cubiques. La spécificité de ces métallacages cubiques repose sur l'intégration des PS dans la structure initiale de la cage, ce qui permet de maintenir une excellente solubilité physiologique et de garder les PS disponibles pour être irradiés à tout moment.

Dans notre projet, nous nous sommes intéressés au deuxième type d'encapsulation, où la cage métallique est de forme cubique transportant dans sa propre structure deux unités de PS de TPyP de formule chimique (5,10,15,20-tétra(4-pyridyl)-21H,23H-porphine) (TPyP-arène-Ru). Cette structure présente des propriétés intéressantes qui en fait un des meilleurs systèmes de vectorisation de PS. Au vu de la structure métallique de la cage, et dans le but de vérifier si la présence d'un métal au sein de la structure du PS pouvait améliorer son effet après photoactivation, le métal diamagnétique (Zn^{2+}) a été introduit au centre de l'anneau du tétrapyrrole de la TPyP (Zn-TPyP-arène-Ru).

L'objectif de ce projet a été d'évaluer l'effet anticancéreux de ces nouveaux PS fonctionnalisés par des cages de Ru *in vitro* sur deux lignées cellulaires de CCR humain HCT116 et HT-29, puis de comparer la photoactivité du PS lorsqu'il est conjugué à un métal. Finalement, la compréhension du processus de mort cellulaire engendré par ces deux complexes et responsable de leur effet anti-cancéreux a été étudiée

Les résultats ont montré que les deux complexes TPyP-arène-Ru et Zn-TPyP-arène-Ru photoactivés ont un effet anticancéreux très intéressant sur les deux lignées du CCR étudiées HCT116 et HT-29, les IC_{50} déterminées étant de l'ordre du nanomolaire. De même, nous avons remarqué que le métal diminuait légèrement l'efficacité du PS, puisque la TPyP-arène-Ru photoactivée a présenté un meilleur effet phototoxique que son analogue. Mais dans tous les cas les deux systèmes ont montré un effet d'encapsulation très intéressant. De plus, nous avons montré que ces deux complexes ne présentaient aucun effet cytotoxique à l'obscurité sur les cellules HCT116 et HT-29.

Nous avons prouvé également que cet effet anticancéreux est dû à une bonne internalisation cellulaire avec une accumulation mitochondriale et au niveau du RE majoritairement pour ces deux composés.

Dans le but de comprendre le mode d'action de ces deux complexes, nous avons démontré qu'après leur photoactivation, ces deux PS ont engendré une grande production d'ERO qui sont liés directement à la mort cellulaire. De même, nous avons montré que la TPyP-arène-Ru et la Zn-TPyP-arène-Ru photoactivées ont induit l'externalisation des phosphatidylsérines membranaires, l'activation significative des caspases-3 et -7, le clivage de la PARP, la fragmentation de l'ADN ainsi que la présence du pic sub-G1.

Après l'analyse de tous ces marqueurs, nous pouvons confirmer que la TPyP-arène-Ru et la Zn-TPyP-arène-Ru entraînent leur effet antiprolifératif par l'induction du processus apoptotique.

L'effet phototoxique important de ces deux assemblages, ainsi que leurs doses réduites pour un meilleur effet thérapeutique, leur non toxicité à l'obscurité, leur stabilité et leur ciblage tumoral font que ces métallages apparaissent comme un des meilleurs systèmes de vectorisation de PS utilisé à des fins thérapeutiques contre le CCR.

Afin de poursuivre ce projet sur le plan *in vitro*, il serait intéressant d'étudier l'effet de la photoactivation de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru sur les différentes voies de signalisation qui sont en relation avec la prolifération cellulaire comme PI3K/Akt, ERK, NF- κ B.

De même, il est connu que lors des traitements par PDT, dans la majorité des cas, l'autophagie joue un rôle essentiel dans la résistance à l'apoptose. Plusieurs études ont montré qu'une inhibition de l'autophagie au cours de la PDT permet de potentialiser l'index thérapeutique de cette dernière [243] [244]. Par conséquent, l'autophagie semble être une cible de choix afin de décupler l'efficacité anticancéreuse des PS. En se référant à ces études, il serait efficient d'analyser *in vitro* l'effet de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru couplées à la PDT après inhibition de l'autophagie.

L'un des défis majeurs du processus de découverte des médicaments est le développement de tests cellulaires biologiquement pertinents et prédictifs pour le criblage des PS. L'intégration des modèles de tests tridimensionnels (3D) est de plus en plus fréquente pour la conduite de la biologie translationnelle. Les modèles cellulaires hautement complexes sont de plus en plus populaires car ils imitent mieux les environnements *in vivo* et les réponses au traitement médicamenteux. Plus spécifiquement, les cultures cellulaires 3D présentent l'avantage de reproduire fidèlement certains aspects des tissus humains, notamment l'architecture, l'organisation cellulaire, les interactions cellule-cellule et cellule-matrice et les caractéristiques de diffusion les plus pertinentes sur le plan physiologique. L'utilisation des tests cellulaires 3D ajoute de la valeur aux recherches comblant l'écart translationnel entre les cultures cellulaires 2D et les modèles animaux.

Il serait pertinent alors de tester l'effet anticancéreux de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru photoactivées par la lumière rouge sur des modèles 3D du CCR.

Enfin, pour qu'un traitement passe en phase clinique, il doit être testé *in vivo* sur un modèle animal. En effet, dans le but de valoriser l'étude de l'effet antiprolifératif de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru couplées à la PDT, il serait important de tester ces deux complexes sur un modèle de xélogreffe sous-cutanée de CCR humain en utilisant des souris immunodéficientes. Il faudrait évaluer leurs effets sur la croissance tumorale, ainsi que confirmer le processus apoptotique dans les tumeurs par lequel nos assemblages métalliques entraînent leur effet antiprolifératif. Comme nous avons déjà expliqué, le rôle de l'autophagie dans la résistance apoptotique, il serait avantageux d'étudier l'inhibition de l'autophagie dans le modèle *in vivo* à étudier. Il serait intéressant alors d'étudier sur le modèle animal la biodistribution de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru afin de mettre en évidence l'effet EPR dans la tumeur, par greffage d'anticorps monoclonaux sur ces assemblages métalliques.

De même, dans le but de vérifier l'effet de ces deux complexes sur les différents organes du modèle utilisé, il serait valable d'étudier leur biocompatibilité et leur durée d'élimination du corps de l'animal.

En effet, des modèles de souris génétiquement modifiées développant des CCR utilisées dans la recherche miment fortement les relations hôte/tumeurs, le microenvironnement tumoral, le système immunitaire ainsi qu'une croissance tumorale plus proche de celle retrouvée en phase clinique.

Il s'avèrerait donc très important de réaliser l'évaluation de l'efficacité anticancéreuse de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru sur le microenvironnement tumoral dans le but de mieux comprendre l'interaction du système immunitaire de l'hôte avec l'intervention de la

PDT. Il est important de même de tester ces complexes sur plusieurs modèles *in vivo* avant de pouvoir les transposer comme futurs traitements en phase clinique sur l'Homme.

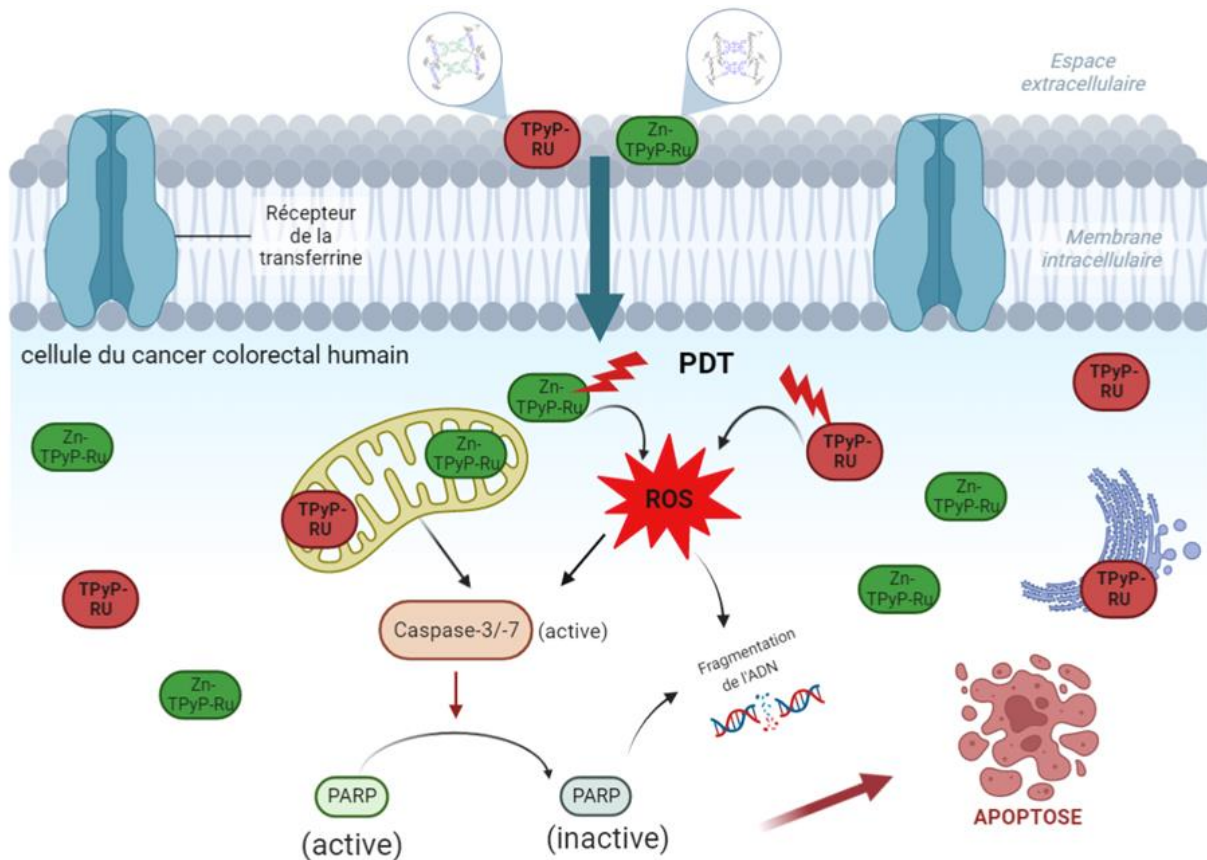


Figure 90 : Bilan des effets de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru photoactivées dans les cellules cancéreuses colorectales. Créé par J.M via Biorender.com

En résumé, le CCR est la deuxième cause de décès au niveau mondial par cancer. Les effets secondaires indésirables des traitements conventionnels, la résistance à ces traitements et les récurrences de tumeurs, impliquent la découverte urgente de nouvelles thérapies. La PDT s'est avérée être une innovation thérapeutique dans le traitement des CCR. La TPyP-arène-Ru et la Zn-TPyP-arène-Ru ont été utilisées dans cette étude pour leurs propriétés exceptionnelles en tant que futures PS à fort potentiel. En effet, ces deux PS ciblent les cellules du CCR via l'affinité du Ru aux sites de liaison de la transferrine. Une fois internalisés dans les cellules cancéreuses par endocytose, ils s'accumulent majoritairement dans le cytoplasme (mitochondrie et RE). Après photoactivation par une lumière rouge appropriée, ces deux complexes induisent une forte génération d'ERO déclenchant la cascade de signalisation de la mort cellulaire par apoptose. En effet, leur photoactivation engendre l'activation de la cascade des caspases, clivant à leur tour la PARP aboutissant finalement à la fragmentation de l'ADN.

Références bibliographiques

- [1] F. H. Netter, « [9782294741715] Atlas d'anatomie humaine », p. 624.
- [2] V. Martin et F. Vicari, « Atlas d'anatomie humaine », *Acta Endosc.*, vol. 34, n° 4, p. 630-630, août 2004, doi: 10.1007/BF03006357.
- [3] H. H. Li-Chang *et al.*, *Atlas of Intestinal Pathology: Volume 1: Neoplastic Diseases of the Intestines*. Cham: Springer International Publishing, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-12379-6.
- [4] P. Poitras, Éd., *L'appareil digestif: Des sciences fondamentales à la clinique*. Les Presses de l'Université de Montréal, 2016. doi: 10.2307/j.ctv69tdtm.
- [5] Agence universitaire de la francophonie, Éd., *Gastro-entérologie*, Nouvelle éd. Paris: Ellipses, 2005.
- [6] « 190925-Gastrointestinal-tract-5-the-anatomy-and-functions-of-the-large-intestine (1).pdf ».
- [7] C. W. Hammerle et C. M. Surawicz, « Updates on treatment of irritable bowel syndrome », *World J. Gastroenterol.*, vol. 14, n° 17, p. 2639, 2008, doi: 10.3748/wjg.14.2639.
- [8] T. Banasiewicz *et al.*, « The influence of rifaximin on diverticulitis rate and quality of life in patients with diverticulosis », *Pol. J. Surg.*, vol. 89, n° 1, p. 22-31, févr. 2017, doi: 10.5604/01.3001.0009.6012.
- [9] L. L. Strate *et al.*, « Heritability and Familial Aggregation of Diverticular Disease: A Population-Based Study of Twins and Siblings », *Gastroenterology*, vol. 144, n° 4, p. 736-742.e1, avr. 2013, doi: 10.1053/j.gastro.2012.12.030.
- [10] A. Tursi, « Diverticulosis today: unfashionable and still under-researched », *Ther. Adv. Gastroenterol.*, vol. 9, n° 2, p. 213-228, mars 2016, doi: 10.1177/1756283X15621228.
- [11] « <https://chirurgie-besancon.fr/colon-rectum/diverticules/> ».
- [12] N. Dmochowska, H. Wardill, et P. Hughes, « Advances in Imaging Specific Mediators of Inflammatory Bowel Disease », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, n° 9, p. 2471, août 2018, doi: 10.3390/ijms19092471.
- [13] J. Torres, S. Mehandru, J.-F. Colombel, et L. Peyrin-Biroulet, « Crohn's disease », *The Lancet*, vol. 389, n° 10080, p. 1741-1755, avr. 2017, doi: 10.1016/S0140-6736(16)31711-1.
- [14] T. Kucharzik, S. Koletzko, K. Kannengießer, et A. Dignaß, « Ulcerative Colitis—Diagnostic and Therapeutic Algorithms », *Dtsch. Ärztebl. Int.*, août 2020, doi: 10.3238/arztebl.2020.0564.
- [15] « <https://www.alamyimages.fr/inflammytory-l-intestin-medical-vector-illustration-sur-fond-blanc-image236206603.html?ima> ».
- [16] N. K. Vishvakarma, G. P. Nagaraju, et D. Shukla, Éd., *Colon Cancer Diagnosis and Therapy: Volume 2*. Cham: Springer International Publishing, 2021. doi: 10.1007/978-3-030-64668-4.

- [17] M. Kouki et A. Germain, « Chapter 15 - Cancer colorectal et vie professionnelle, vie familiale et vie sociale », in *Cancérologie Colorectale*, J.-L. FAUCHERON, Éd. Paris: Elsevier Masson, 2020, p. 215-222. doi: 10.1016/B978-2-294-77454-6.00015-5.
- [18] M. Colonna, « Chapter 1 - Épidémiologie », in *Cancérologie Colorectale*, J.-L. FAUCHERON, Éd. Paris: Elsevier Masson, 2020, p. 1-10. doi: 10.1016/B978-2-294-77454-6.00001-5.
- [19] F. Bray, J. Ferlay, I. Soerjomataram, R. L. Siegel, L. A. Torre, et A. Jemal, « Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries », *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 68, n° 6, p. 394-424, nov. 2018, doi: 10.3322/caac.21492.
- [20] « <https://gco.iarc.fr> ».
- [21] B. Moghimi-Dehkordi, « An overview of colorectal cancer survival rates and prognosis in Asia », *World J. Gastrointest. Oncol.*, vol. 4, n° 4, p. 71, 2012, doi: 10.4251/wjgo.v4.i4.71.
- [22] K. Katsaounou *et al.*, « Colon Cancer: From Epidemiology to Prevention », *Metabolites*, vol. 12, n° 6, p. 499, mai 2022, doi: 10.3390/metabo12060499.
- [23] T. Sawicki, M. Ruzkowska, A. Danielewicz, E. Niedźwiedzka, T. Arłukowicz, et K. E. Przybyłowicz, « A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis », *Cancers*, vol. 13, n° 9, p. 2025, avr. 2021, doi: 10.3390/cancers13092025.
- [24] « Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 1 – Tumeurs solides », p. 372.
- [25] A. Seigneurin et P. Delafosse, « Chapter 3 - Dépistage », in *Cancérologie Colorectale*, J.-L. FAUCHERON, Éd. Paris: Elsevier Masson, 2020, p. 21-30. doi: 10.1016/B978-2-294-77454-6.00003-9.
- [26] « https://www.has-sante.fr/jcms/c_2772744/fr/cancer-colorectal-modalites-de-depistage-et-de-prevention-chez-les-sujets-a-risque-eleve-et-tres-eleve ».
- [27] O. Engin, Éd., *Colon Polyps and the Prevention of Colorectal Cancer*. Cham: Springer International Publishing, 2015. doi: 10.1007/978-3-319-17993-3.
- [28] C. Hobeika et J. Lefevre, « Chapter 4 - Bilan du cancer colorectal », in *Cancérologie Colorectale*, J.-L. FAUCHERON, Éd. Paris: Elsevier Masson, 2020, p. 31-50. doi: 10.1016/B978-2-294-77454-6.00004-0.
- [29] L. H. Biller, S. Syngal, et M. B. Yurgelun, « Recent advances in Lynch syndrome », *Fam. Cancer*, vol. 18, n° 2, p. 211-219, avr. 2019, doi: 10.1007/s10689-018-00117-1.
- [30] A. K. Win *et al.*, « Variation in the risk of colorectal cancer in families with Lynch syndrome: a retrospective cohort study », *Lancet Oncol.*, vol. 22, n° 7, p. 1014-1022, juill. 2021, doi: 10.1016/S1470-2045(21)00189-3.
- [31] H. H. Li-Chang *et al.*, *Atlas of Intestinal Pathology: Volume 1: Neoplastic Diseases of the Intestines*. Cham: Springer International Publishing, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-12379-6.
- [32] G. P. Nagaraju, D. Shukla, et N. K. Vishvakarma, Éd., *Colon Cancer Diagnosis and Therapy: Volume 1*. Cham: Springer International Publishing, 2021. doi: 10.1007/978-3-030-63369-1.

- [33] P. Poitras, *L'appareil digestif: des sciences fondamentales à la clinique*. Montréal, Québec: Presses de l'Université de Montréal, 2014.
- [34] S. Bhattacharya, « Colorectal Cancer Diagnosis and Therapeutic Updates », p. 137.
- [35] E. Dekker, P. J. Tanis, J. L. A. Vleugels, P. M. Kasi, et M. B. Wallace, « Colorectal cancer », *The Lancet*, vol. 394, n° 10207, p. 1467-1480, oct. 2019, doi: 10.1016/S0140-6736(19)32319-0.
- [36] V. Balchen et K. Simon, « Colorectal cancer development and advances in screening », *Clin. Interv. Aging*, vol. Volume 11, p. 967-976, juill. 2016, doi: 10.2147/CIA.S109285.
- [37] M. Świdarska *et al.*, « Review The diagnostics of colorectal cancer », *Współczesna Onkol.*, vol. 1, p. 1-6, 2014, doi: 10.5114/wo.2013.39995.
- [38] P. Quirke, G. T. Williams, N. Ectors, A. Ensari, F. Piard, et I. Nagtegaal, « The future of the TNM staging system in colorectal cancer: time for a debate? », *Lancet Oncol.*, vol. 8, n° 7, p. 651-657, juill. 2007, doi: 10.1016/S1470-2045(07)70205-X.
- [39] L. H. Sobin, M. K. Gospodarowicz, et C. Wittekind, « TNM Classification of Malignant Tumours », p. 332.
- [40] A. Shaikat *et al.*, « Endoscopic Recognition and Management Strategies for Malignant Colorectal Polyps: Recommendations of the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer », *Gastroenterology*, vol. 159, n° 5, p. 1916-1934.e2, nov. 2020, doi: 10.1053/j.gastro.2020.08.050.
- [41] « <http://oncolex.org> ».
- [42] « <https://www.cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer/stages> ».
- [43] R. Labianca *et al.*, « Colon cancer », *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, vol. 74, n° 2, p. 106-133, mai 2010, doi: 10.1016/j.critrevonc.2010.01.010.
- [44] L. Bretin, « Thérapie photodynamique (PDT) dans un modèle in vitro et in vivo de cancer colorectal : utilisation d'un photosensibilisateur nanovectorisé », phdthesis, Université de Limoges, 2019. Consulté le: 20 septembre 2021. [En ligne]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02443215>
- [45] A. Challine, Y. Panis, et L. Maggiori, « Chapter 5 - Cancer colorectal : traitement de la forme isolée », in *Cancérologie Colorectale*, J.-L. FAUCHERON, Éd. Paris: Elsevier Masson, 2020, p. 51-72. doi: 10.1016/B978-2-294-77454-6.00005-2.
- [46] H. Ishida et K. Koda, *Recent advances in the treatment of colorectal cancer*. Singapore: Springer, 2019.
- [47] « <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/La-stomie-digestive> ».
- [48] G. Baatrup, Éd., *Multidisciplinary Treatment of Colorectal Cancer: Staging – Treatment – Pathology – Palliation*. Cham: Springer International Publishing, 2021. doi: 10.1007/978-3-030-58846-5.
- [49] B. Gustavsson *et al.*, « A Review of the Evolution of Systemic Chemotherapy in the Management of Colorectal Cancer », *Clin. Colorectal Cancer*, vol. 14, n° 1, p. 1-10, mars 2015, doi: 10.1016/j.clcc.2014.11.002.
- [50] S. Bhattacharya, « Colorectal Cancer Diagnosis and Therapeutic Updates », p. 137.

- [51] E. C. LaCasse, D. J. Mahoney, H. H. Cheung, S. Plenchette, S. Baird, et R. G. Korneluk, « IAP-targeted therapies for cancer », *Oncogene*, vol. 27, n° 48, p. 6252-6275, oct. 2008, doi: 10.1038/onc.2008.302.
- [52] W. A. Messersmith et D. J. Ahnen, « Targeting EGFR in Colorectal Cancer », *N. Engl. J. Med.*, vol. 359, n° 17, p. 1834-1836, oct. 2008, doi: 10.1056/NEJMe0806778.
- [53] Y. Ohhara *et al.*, « Role of targeted therapy in metastatic colorectal cancer », *World J. Gastrointest. Oncol.*, vol. 8, n° 9, p. 642, 2016, doi: 10.4251/wjgo.v8.i9.642.
- [54] « <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-du-colon/La-chimiotherapie-et-les-therapies-ciblees> ».
- [55] R. W. Wilkinson et A. J. Leishman, « Further Advances in Cancer Immunotherapy: Going Beyond Checkpoint Blockade », *Front. Immunol.*, vol. 9, p. 1082, juin 2018, doi: 10.3389/fimmu.2018.01082.
- [56] E. Vigna et P. M. Comoglio, « Targeting the oncogenic Met receptor by antibodies and gene therapy », *Oncogene*, vol. 34, n° 15, p. 1883-1889, avr. 2015, doi: 10.1038/onc.2014.142.
- [57] A. L. C. de S. L. Oliveira, T. Schomann, L.-F. de Geus-Oei, E. Kapiteijn, L. J. Cruz, et R. F. de Araújo Junior, « Nanocarriers as a Tool for the Treatment of Colorectal Cancer », *Pharmaceutics*, vol. 13, n° 8, p. 1321, août 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13081321.
- [58] Y. Tian, H. Kim, et H. W. Kang, « In vitro anti-tumor effect of high-fluence low-power laser light on apoptosis of human colorectal cancer cells », *Lasers Med. Sci.*, vol. 36, n° 3, p. 513-520, avr. 2021, doi: 10.1007/s10103-020-03050-x.
- [59] A. Bienia, O. Wiecheć-Cudak, A. A. Murzyn, et M. Krzykawska-Serda, « Photodynamic Therapy and Hyperthermia in Combination Treatment—Neglected Forces in the Fight against Cancer », *Pharmaceutics*, vol. 13, n° 8, p. 1147, juill. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13081147.
- [60] P. Agostinis *et al.*, « Photodynamic therapy of cancer: An update », *CA. Cancer J. Clin.*, vol. 61, n° 4, p. 250-281, juill. 2011, doi: 10.3322/caac.20114.
- [61] H. Sharifkazemi, S. M. Amini, R. Koohi Ortakand, et B. Narouie, « A Review of Photodynamic Therapy in Different Types of Tumors », *Transl. Res. Urol.*, vol. 4, n° 2, avr. 2022, doi: 10.22034/tru.2022.337411.1108.
- [62] U. Chilakamarthi et L. Giribabu, « Photodynamic Therapy: Past, Present and Future », *Chem. Rec.*, vol. 17, n° 8, p. 775-802, août 2017, doi: 10.1002/tcr.201600121.
- [63] N. W. Nompumelelo Simelane, C. A. Kruger, et H. Abrahamse, « Photodynamic diagnosis and photodynamic therapy of colorectal cancer *in vitro* and *in vivo* », *RSC Adv.*, vol. 10, n° 68, p. 41560-41576, 2020, doi: 10.1039/D0RA08617G.
- [64] S. Xu, A.-L. Bulin, A. Hurbin, H. Elleaume, J.-L. Coll, et M. Broekgaarden, « Photodynamic Diagnosis and Therapy for Peritoneal Carcinomatosis: Emerging Perspectives », *Cancers*, vol. 12, n° 9, p. 2491, sept. 2020, doi: 10.3390/cancers12092491.
- [65] F. Acerbi *et al.*, « Is fluorescein-guided technique able to help in resection of high-grade gliomas? », *Neurosurg. Focus*, vol. 36, n° 2, p. E5, févr. 2014, doi: 10.3171/2013.11.FOCUS13487.

- [66] T. B. Manny, A. S. Pompeo, et A. K. Hemal, « Robotic Partial Adrenalectomy Using Indocyanine Green Dye With Near-infrared Imaging: The Initial Clinical Experience », *Urology*, vol. 82, n° 3, p. 738-742, sept. 2013, doi: 10.1016/j.urology.2013.03.074.
- [67] Q. R. J. G. Tummers *et al.*, « Real-time intraoperative detection of breast cancer using near-infrared fluorescence imaging and Methylene Blue », *Eur. J. Surg. Oncol. EJSO*, vol. 40, n° 7, p. 850-858, juill. 2014, doi: 10.1016/j.ejso.2014.02.225.
- [68] J. R. van der Vorst *et al.*, « Intraoperative near-infrared fluorescence imaging of parathyroid adenomas with use of low-dose methylene blue: Intraoperative NEAR - INFRARED FLUORESCENCE IMAGING OF PARATHYROID ADENOMAS », *Head Neck*, vol. 36, n° 6, p. 853-858, juin 2014, doi: 10.1002/hed.23384.
- [69] F. Aydogan, V. Ozben, E. Aytac, H. Yilmaz, A. Cercel, et V. Celik, « Excision of Nonpalpable Breast Cancer with Indocyanine Green Fluorescence-Guided Occult Lesion Localization (IFOLL) », *Breast Care*, vol. 7, n° 1, p. 48-51, 2012, doi: 10.1159/000336497.
- [70] C. Fidanzi-Dugas, « Utilisation de nouveaux photosensibilisateurs pour le traitement du cancer de la prostate par photothérapie dynamique : Etude in vitro et in vivo », 2016.
- [71] N. Hodgkinson, C. A. Kruger, et H. Abrahamse, « Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells », *Tumor Biol.*, vol. 39, n° 10, p. 101042831773469, oct. 2017, doi: 10.1177/1010428317734691.
- [72] F. P. Sellera, C. L. Nascimento, et M. S. Ribeiro, Éd., *Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice*. Cham: Springer International Publishing, 2016. doi: 10.1007/978-3-319-45007-0.
- [73] M. R. Hamblin et Y.-Y. Huang, Éd., *Handbook of photomedicine*, First issued in paperback 2020. Boca Raton, FL: CRC Press : Taylor & Francis Group, 2020.
- [74] S. Dobre, « Analyses de sensibilité et d'identifiabilité globales : application à l'estimation de paramètres photophysiques en thérapie photodynamique », 2010.
- [75] R. W. Redmond et J. N. Gamlin, « A compilation of singlet oxygen yields from biologically relevant molecules », *Photochem. Photobiol.*, vol. 70, n° 4, p. 391-475, oct. 1999.
- [76] C. S. Foote, « DEFINITION OF TYPE I and TYPE II PHOTOSENSITIZED OXIDATION », *Photochem. Photobiol.*, vol. 54, n° 5, p. 659-659, nov. 1991, doi: 10.1111/j.1751-1097.1991.tb02071.x.
- [77] *Photophysique et photochimie: des fondements aux applications*. Les Ulis: EDP sciences, 2016.
- [78] M. S. Baptista *et al.*, « Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways », *Photochem. Photobiol.*, vol. 93, n° 4, p. 912-919, juill. 2017, doi: 10.1111/php.12716.
- [79] T. T. Tasso *et al.*, « Photobleaching Efficiency Parallels the Enhancement of Membrane Damage for Porphyrazine Photosensitizers », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 141, n° 39, p. 15547-15556, oct. 2019, doi: 10.1021/jacs.9b05991.

- [80] R. Bonnett et G. Martínez, « Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy », *Tetrahedron*, vol. 57, n° 47, p. 9513-9547, nov. 2001, doi: 10.1016/S0040-4020(01)00952-8.
- [81] B. Krammer et K. Plaetzer, « ALA and its clinical impact, from bench to bedside », *Photochem Photobiol Sci*, vol. 7, n° 3, p. 283-289, 2008, doi: 10.1039/B712847A.
- [82] H. Abrahamse et M. R. Hamblin, « New photosensitizers for photodynamic therapy », *Biochem. J.*, vol. 473, n° 4, p. 347-364, févr. 2016, doi: 10.1042/BJ20150942.
- [83] M. R. Hamblin et C. P. Sabino, « Photosensitizers », in *Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice*, F. P. Sellera, C. L. Nascimento, et M. S. Ribeiro, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2016, p. 25-43. doi: 10.1007/978-3-319-45007-0_3.
- [84] VERTEPORFIN ROUNDTABLE PARTICIPANTS, « GUIDELINES FOR USING VERTEPORFIN (VISUDYNE) IN PHOTODYNAMIC THERAPY FOR CHOROIDDAL NEOVASCULARIZATION DUE TO AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION AND OTHER CAUSES: UPDATE »:, *Retina*, vol. 25, n° 2, p. 119-134, févr. 2005, doi: 10.1097/00006982-200502000-00002.
- [85] Chadlia Mchiri, « Spectroscopic and structural characterization of new porphyrinic complexes of cadmium (II) and vanadium (IV). Synthesis and photophysics study of a new porphyrin-peptide compound for therapeutic applications », 2018, doi: 10.13140/RG.2.2.30386.84167.
- [86] I. S. Mfouo-Tynga, L. D. Dias, N. M. Inada, et C. Kurachi, « Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review », *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 34, p. 102091, juin 2021, doi: 10.1016/j.pdpdt.2020.102091.
- [87] H. Abrahamse et M. R. Hamblin, « New photosensitizers for photodynamic therapy », *Biochem. J.*, vol. 473, n° 4, p. 347-364, févr. 2016, doi: 10.1042/BJ20150942.
- [88] S. Bouramtane, « Vectorisation cellulaire et adressage mitochondrial de photosensibilisateurs par des nanoparticules formées de xylane de bois de feuillus: nouvelle voie de valorisation d'hémicellulose pour une application en PDT », p. 255.
- [89] A. R. Battersby, « Tetrapyrroles: the pigments of life », *Nat. Prod. Rep.*, vol. 17, n° 6, p. 507-526, 2000, doi: 10.1039/b002635m.
- [90] D. Kessel, « Photosensitization with Derivatives of Haematoporphyrin », *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.*, vol. 49, n° 6, p. 901-907, janv. 1986, doi: 10.1080/09553008514553131.
- [91] S. Kwiatkowski *et al.*, « Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations », *Biomed. Pharmacother.*, vol. 106, p. 1098-1107, oct. 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.
- [92] M. O. Senge et J. C. Brandt, « Temoporfin (Foscan®), 5,10,15,20-Tetra(m-hydroxyphenyl)chlorin)-A Second-generation Photosensitizer†,‡: Photochemistry and Photobiology », *Photochem. Photobiol.*, vol. 87, n° 6, p. 1240-1296, nov. 2011, doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.00986.x.
- [93] W. M. Chan, T.-H. Lim, A. Pece, R. Silva, et N. Yoshimura, « Verteporfin PDT for non-standard indications—a review of current literature », *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 248, n° 5, p. 613-626, mai 2010, doi: 10.1007/s00417-010-1307-z.

- [94] C. M. Moore *et al.*, « Determination of optimal drug dose and light dose index to achieve minimally invasive focal ablation of localised prostate cancer using WST11-vascular-targeted photodynamic (VTP) therapy », *BJU Int.*, vol. 116, n° 6, p. 888-896, déc. 2015, doi: 10.1111/bju.12816.
- [95] C. Y. Anderson *et al.*, « A comparative analysis of silicon phthalocyanine photosensitizers for in vivo photodynamic therapy of RIF-1 tumors in C3H mice », *Photochem. Photobiol.*, vol. 67, n° 3, p. 332-336, mars 1998.
- [96] B. Goff, U. Hermanto, J. Rumbaugh, J. Blake, M. Bamberg, et T. Hasan, « Photoimmunotherapy and biodistribution with an OC125-chlorin immunoconjugate in an in vivo murine ovarian cancer model », *Br. J. Cancer*, vol. 70, n° 3, p. 474-480, sept. 1994, doi: 10.1038/bjc.1994.330.
- [97] S. Kaščáková *et al.*, « Somatostatin Analogues for Receptor Targeted Photodynamic Therapy », *PLoS ONE*, vol. 9, n° 8, p. e104448, août 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0104448.
- [98] T. N. Demidova et M. R. Hamblin, « Effect of Cell-Photosensitizer Binding and Cell Density on Microbial Photoinactivation », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, n° 6, p. 2329-2335, juin 2005, doi: 10.1128/AAC.49.6.2329-2335.2005.
- [99] T. N. Demidova et M. R. Hamblin, « Macrophage-Targeted Photodynamic Therapy », *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.*, vol. 17, n° 2, p. 117-126, mai 2004, doi: 10.1177/039463200401700203.
- [100] H. You, H.-E. Yoon, P.-H. Jeong, H. Ko, J.-H. Yoon, et Y.-C. Kim, « Pheophorbide-a conjugates with cancer-targeting moieties for targeted photodynamic cancer therapy », *Bioorg. Med. Chem.*, vol. 23, n° 7, p. 1453-1462, avr. 2015, doi: 10.1016/j.bmc.2015.02.014.
- [101] N. El-Akra, A. Noiro, J.-C. Faye, et J.-P. Souchard, « Synthesis of estradiol–pheophorbide a conjugates: evidence of nuclear targeting, DNA damage and improved photodynamic activity in human breast cancer and vascular endothelial cells », *Photochem Photobiol Sci*, vol. 5, n° 11, p. 996-999, 2006, doi: 10.1039/B606117F.
- [102] S. Ballut *et al.*, « Tumor targeting in photodynamic therapy. From glycoconjugated photosensitizers to glycodendrimeric one. Concept, design and properties », *Org. Biomol. Chem.*, vol. 10, n° 23, p. 4485, 2012, doi: 10.1039/c2ob25181g.
- [103] N. Spyropoulos-Antonakakis *et al.*, « Selective aggregation of PAMAM dendrimer nanocarriers and PAMAM/ZnPc nanodrugs on human atheromatous carotid tissues: a photodynamic therapy for atherosclerosis », *Nanoscale Res. Lett.*, vol. 10, n° 1, p. 210, déc. 2015, doi: 10.1186/s11671-015-0904-5.
- [104] M. O. Senge, « mTHPC – A drug on its way from second to third generation photosensitizer? », *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 9, n° 2, p. 170-179, juin 2012, doi: 10.1016/j.pdpdt.2011.10.001.
- [105] J. Tu *et al.*, « Multifunctional ZnPc-loaded mesoporous silica nanoparticles for enhancement of photodynamic therapy efficacy by endolysosomal escape », *Biomaterials*, vol. 33, n° 31, p. 7903-7914, nov. 2012, doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.07.025.
- [106] A. El-Hussein, I. Mfouo-Tynga, M. Abdel-Harith, et H. Abrahamse, « Comparative study between the photodynamic ability of gold and silver nanoparticles in mediating cell

- death in breast and lung cancer cell lines », *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 153, p. 67-75, déc. 2015, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.08.028.
- [107] C.-K. Chu *et al.*, « Combination of photothermal and photodynamic inactivation of cancer cells through surface plasmon resonance of a gold nanoring », *Nanotechnology*, vol. 27, n° 11, p. 115102, mars 2016, doi: 10.1088/0957-4484/27/11/115102.
- [108] M. J. Meziani *et al.*, « Visible-Light-Activated Bactericidal Functions of Carbon “Quantum” Dots », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, n° 17, p. 10761-10766, mai 2016, doi: 10.1021/acsami.6b01765.
- [109] S. Li *et al.*, « Amplified Singlet Oxygen Generation in Semiconductor Polymer Dots for Photodynamic Cancer Therapy », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 8, n° 6, p. 3624-3634, févr. 2016, doi: 10.1021/acsami.5b07995.
- [110] S. Jin *et al.*, « A new near infrared photosensitizing nanoplatfrom containing blue-emitting up-conversion nanoparticles and hypocrellin A for photodynamic therapy of cancer cells », *Nanoscale*, vol. 5, n° 23, p. 11910, 2013, doi: 10.1039/c3nr03515h.
- [111] T. A. Theodossiou, J. S. Hothersall, P. A. De Witte, A. Pantos, et P. Agostinis, « The Multifaceted Photocytotoxic Profile of Hypericin », *Mol. Pharm.*, vol. 6, n° 6, p. 1775-1789, déc. 2009, doi: 10.1021/mp900166q.
- [112] T. Maisch *et al.*, « Fast and Effective Photodynamic Inactivation of Multiresistant Bacteria by Cationic Riboflavin Derivatives », *PLoS ONE*, vol. 9, n° 12, p. e111792, déc. 2014, doi: 10.1371/journal.pone.0111792.
- [113] N. Tortik, P. Steinbacher, T. Maisch, A. Spaeth, et K. Plaetzer, « A comparative study on the antibacterial photodynamic efficiency of a curcumin derivative and a formulation on a porcine skin model », *Photochem. Photobiol. Sci.*, vol. 15, n° 2, p. 187-195, 2016, doi: 10.1039/C5PP00393H.
- [114] M. Wainwright et K. B. Crossley, « Methylene Blue - a Therapeutic Dye for All Seasons? », *J. Chemother.*, vol. 14, n° 5, p. 431-443, janv. 2002, doi: 10.1179/joc.2002.14.5.431.
- [115] L. Cincotta, J. W. Foley, T. MacEachern, E. Lampros, et A. H. Cincotta, « Novel photodynamic effects of a benzophenothiazine on two different murine sarcomas », *Cancer Res.*, vol. 54, n° 5, p. 1249-1258, mars 1994.
- [116] M. F. M. Ali, « Topical delivery and photodynamic evaluation of a multivesicular liposomal Rose Bengal », *Lasers Med. Sci.*, vol. 26, n° 2, p. 267-275, mars 2011, doi: 10.1007/s10103-010-0859-9.
- [117] K. M. Mahmud, M. S. Niloy, M. S. Shakil, et M. A. Islam, « Ruthenium Complexes: An Alternative to Platinum Drugs in Colorectal Cancer Treatment », *Pharmaceutics*, vol. 13, n° 8, p. 1295, août 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13081295.
- [118] W. Lei, Q. Zhou, G. Jiang, B. Zhang, et X. Wang, « Photodynamic inactivation of Escherichia coli by Ru(II) complexes », *Photochem. Photobiol. Sci. Off. J. Eur. Photochem. Assoc. Eur. Soc. Photobiol.*, vol. 10, n° 6, p. 887-890, juin 2011, doi: 10.1039/c0pp00275e.
- [119] M. R. Hamblin et C. P. Sabino, « Systemic Effects », in *Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice*, F. P. Sellera, C. L. Nascimento, et M. S. Ribeiro, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2016, p. 73-91. doi: 10.1007/978-3-319-45007-0_6.

- [120] E. Maugain, S. Sasnouski, V. Zorin, J.-L. Merlin, F. Guillemin, et L. Bezdetnaya, « Foscan-based photodynamic treatment in vivo: correlation between efficacy and Foscan accumulation in tumor, plasma and leukocytes », *Oncol. Rep.*, vol. 12, n° 3, p. 639-645, sept. 2004.
- [121] D. A. Bellnier, Y. K. Ho, R. K. Pandey, J. R. Missert, et T. J. Dougherty, « Distribution and elimination of Photofrin II in mice », *Photochem. Photobiol.*, vol. 50, n° 2, p. 221-228, août 1989, doi: 10.1111/j.1751-1097.1989.tb04152.x.
- [122] M. J. Egorin, E. G. Zuhowski, D. L. Sentz, J. M. Dobson, P. S. Callery, et J. L. Eiseman, « Plasma pharmacokinetics and tissue distribution in CD2F1 mice of Pc4 (NSC 676418), a silicone phthalocyanine photodynamic sensitizing agent », *Cancer Chemother. Pharmacol.*, vol. 44, n° 4, p. 283-294, 1999, doi: 10.1007/s002800050979.
- [123] F. Lamarche, V. Sol, Y.-M. Huang, R. Granet, M. Guilloton, et P. Krausz, « Synthesis and biological evaluation of polyamine-porphyrin conjugates as potential agents in photodynamic therapy (PDT) », *J. Porphyr. Phthalocyanines*, vol. 06, n° 02, p. 130-134, févr. 2002, doi: 10.1142/S1088424602000178.
- [124] I. Laville *et al.*, « Photodynamic Efficiency of Diethylene Glycol-Linked Glycoconjugated Porphyrins in Human Retinoblastoma Cells », *J. Med. Chem.*, vol. 49, n° 8, p. 2558-2567, avr. 2006, doi: 10.1021/jm0580151.
- [125] A. S. Sobolev, D. A. Jans, et A. A. Rosenkranz, « Targeted intracellular delivery of photosensitizers », *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, vol. 73, n° 1, p. 51-90, 2000, doi: 10.1016/s0079-6107(00)00002-x.
- [126] D. Peer, J. M. Karp, S. Hong, O. C. Farokhzad, R. Margalit, et R. Langer, « Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy », *Nat. Nanotechnol.*, vol. 2, n° 12, p. 751-760, déc. 2007, doi: 10.1038/nano.2007.387.
- [127] M. Toussaint, M. barberi-heyob, S. Pinel, et C. Frochot, *How Nanoparticles Can Solve Resistance and Limitation in PDT Efficiency*. 2015. doi: 10.1007/978-3-319-12730-9_9.
- [128] V. Rapozzi et G. Jori, Éd., *Resistance to Photodynamic Therapy in Cancer*, vol. 5. Cham: Springer International Publishing, 2015. doi: 10.1007/978-3-319-12730-9.
- [129] S. Kim, T. Y. Ohulchanskyy, H. E. Pudavar, R. K. Pandey, et P. N. Prasad, « Organically modified silica nanoparticles co-encapsulating photosensitizing drug and aggregation-enhanced two-photon absorbing fluorescent dye aggregates for two-photon photodynamic therapy », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 129, n° 9, p. 2669-2675, mars 2007, doi: 10.1021/ja0680257.
- [130] S. S. Lucky, K. C. Soo, et Y. Zhang, « Nanoparticles in Photodynamic Therapy », *Chem. Rev.*, vol. 115, n° 4, p. 1990-2042, févr. 2015, doi: 10.1021/cr5004198.
- [131] F. Dandash, D. Y. Leger, M. Diab-Assaf, V. Sol, et B. Liagre, « Porphyrin/Chlorin Derivatives as Promising Molecules for Therapy of Colorectal Cancer », *Mol. Basel Switz.*, vol. 26, n° 23, p. 7268, nov. 2021, doi: 10.3390/molecules26237268.
- [132] N. Hodgkinson, C. A. Kruger, et H. Abrahamse, « Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells », *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.*, vol. 39, n° 10, p. 1010428317734691, oct. 2017, doi: 10.1177/1010428317734691.

- [133] A. I. Gavrina *et al.*, « Photodynamic therapy of mouse tumor model using chlorin e6-polyvinyl alcohol complex », *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 178, p. 614-622, janv. 2018, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2017.12.016.
- [134] L. Bretin *et al.*, « Photodynamic Therapy Activity of New Porphyrin-Xylan-Coated Silica Nanoparticles in Human Colorectal Cancer », *Cancers*, vol. 11, n° 10, p. E1474, sept. 2019, doi: 10.3390/cancers11101474.
- [135] N. W. N. Simelane, C. A. Kruger, et H. Abrahamse, « Targeted Nanoparticle Photodynamic Diagnosis and Therapy of Colorectal Cancer », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 22, n° 18, p. 9779, sept. 2021, doi: 10.3390/ijms22189779.
- [136] G. R. Buettner, « The pecking order of free radicals and antioxidants: lipid peroxidation, alpha-tocopherol, and ascorbate », *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 300, n° 2, p. 535-543, févr. 1993, doi: 10.1006/abbi.1993.1074.
- [137] M. Nespolo, « Free Radicals in Biology and Medicine. Fifth Edition. By Barry Halliwell and John M. C. Gutteridge. Oxford University Press, 2015. Pp. xxxviii + 905. Price GBP 70.00 (paperback, ISBN 9780198717485), GBP 125.00 (hardback, ISBN 9780198717478). », *Acta Crystallogr. Sect. Struct. Biol.*, vol. 73, n° 4, Art. n° 4, avr. 2017, doi: 10.1107/S2059798317004533.
- [138] E. Dumont et A. Monari, « Understanding DNA under oxidative stress and sensitization: the role of molecular modeling », *Front. Chem.*, vol. 3, p. 43, 2015, doi: 10.3389/fchem.2015.00043.
- [139] I. Dalle-Donne, R. Rossi, D. Giustarini, A. Milzani, et R. Colombo, « Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress », *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.*, vol. 329, n° 1-2, p. 23-38, mars 2003, doi: 10.1016/s0009-8981(03)00003-2.
- [140] J. Duan et D. L. Kasper, « Oxidative depolymerization of polysaccharides by reactive oxygen/nitrogen species », *Glycobiology*, vol. 21, n° 4, p. 401-409, avr. 2011, doi: 10.1093/glycob/cwq171.
- [141] C. P. Sabino et M. R. Hamblin, « Molecular Damage », in *Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice*, F. P. Sellera, C. L. Nascimento, et M. S. Ribeiro, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2016, p. 45-56. doi: 10.1007/978-3-319-45007-0_4.
- [142] H. Singh, J. Bishop, et J. Merritt, « Singlet oxygen and ribosomes: Inactivation and sites of damage », *J. Photochem.*, vol. 25, n° 2, p. 295-307, juin 1984, doi: 10.1016/0047-2670(84)87032-X.
- [143] N. L. Oleinick, R. L. Morris, et I. Belichenko, « 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.*, vol. 1, n° 1, p. 1-21, janv. 2002, doi: 10.1039/b108586g.
- [144] V. Stoka *et al.*, « Lysosomal protease pathways to apoptosis. Cleavage of bid, not procaspases, is the most likely route », *J. Biol. Chem.*, vol. 276, n° 5, p. 3149-3157, févr. 2001, doi: 10.1074/jbc.M008944200.
- [145] T. Verfaillie, A. D. Garg, et P. Agostinis, « Targeting ER stress induced apoptosis and inflammation in cancer », *Cancer Lett.*, vol. 332, n° 2, p. 249-264, mai 2013, doi: 10.1016/j.canlet.2010.07.016.

- [146] H. Abrahamse et M. R. Hamblin, « New photosensitizers for photodynamic therapy », *Biochem. J.*, vol. 473, n° 4, p. 347-364, févr. 2016, doi: 10.1042/BJ20150942.
- [147] G. G. Chen et P. B. S. Lai, Éd., *Apoptosis in Carcinogenesis and Chemotherapy*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. doi: 10.1007/978-1-4020-9597-9.
- [148] H. J. Zeh et M. T. Lotze, « Addicted to death: invasive cancer and the immune response to unscheduled cell death », *J. Immunother. Hagerstown Md 1997*, vol. 28, n° 1, p. 1-9, févr. 2005, doi: 10.1097/00002371-200501000-00001.
- [149] « D. Moreau, Étude de nouvelles cibles moléculaires de cancer bronchopulmonaire non à petites cellules pharmacomodulées par des substances originales naturelles et synthétiques, Thèse soutenue en 2006, Université de Nantes, France. »
- [150] G. Kroemer *et al.*, « Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death », *Cell Death Differ.*, vol. 12 Suppl 2, p. 1463-1467, nov. 2005, doi: 10.1038/sj.cdd.4401724.
- [151] C. P. Dillon et D. R. Green, « Molecular Cell Biology of Apoptosis and Necroptosis in Cancer », *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 930, p. 1-23, 2016, doi: 10.1007/978-3-319-39406-0_1.
- [152] A. Ashkenazi et G. Salvesen, « Regulated cell death: signaling and mechanisms », *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 30, p. 337-356, 2014, doi: 10.1146/annurev-cellbio-100913-013226.
- [153] S. H. MacKenzie et A. C. Clark, « Death by caspase dimerization », *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 747, p. 55-73, 2012, doi: 10.1007/978-1-4614-3229-6_4.
- [154] D. R. McIlwain, T. Berger, et T. W. Mak, « Caspase functions in cell death and disease », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, n° 4, p. a008656, avr. 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a008656.
- [155] S. Kumar, M. Kinoshita, M. Noda, N. G. Copeland, et N. A. Jenkins, « Induction of apoptosis by the mouse Nedd2 gene, which encodes a protein similar to the product of the *Caenorhabditis elegans* cell death gene *ced-3* and the mammalian IL-1 beta-converting enzyme », *Genes Dev.*, vol. 8, n° 14, p. 1613-1626, juill. 1994, doi: 10.1101/gad.8.14.1613.
- [156] J. Puccini et S. Kumar, « Caspases », in *Encyclopedia of Cell Biology*, Elsevier, 2016, p. 364-373. doi: 10.1016/B978-0-12-394447-4.30049-9.
- [157] J. Chai et Y. Shi, « Apoptosome and inflammasome: Conserved machineries for caspase activation », *Natl. Sci. Rev.*, vol. 1, p. 101-118, janv. 2014, doi: 10.1093/nsr/nwt025.
- [158] C. Pop et G. S. Salvesen, « Human caspases: activation, specificity, and regulation », *J. Biol. Chem.*, vol. 284, n° 33, p. 21777-21781, août 2009, doi: 10.1074/jbc.R800084200.
- [159] S. W. G. Tait et D. R. Green, « Mitochondrial regulation of cell death », *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, vol. 5, n° 9, p. a008706, sept. 2013, doi: 10.1101/cshperspect.a008706.
- [160] C. P. Dillon et D. R. Green, « Molecular Cell Biology of Apoptosis and Necroptosis in Cancer », in *Apoptosis in Cancer Pathogenesis and Anti-cancer Therapy: New Perspectives and Opportunities*, C. D. Gregory, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2016, p. 1-23. doi: 10.1007/978-3-319-39406-0_1.

- [161] C. P. Dillon et D. R. Green, « Molecular Cell Biology of Apoptosis and Necroptosis in Cancer », in *Apoptosis in Cancer Pathogenesis and Anti-cancer Therapy*, vol. 930, C. D. Gregory, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2016, p. 1-23. doi: 10.1007/978-3-319-39406-0_1.
- [162] S. M. Kallenberger *et al.*, « Intra- and interdimeric caspase-8 self-cleavage controls strength and timing of CD95-induced apoptosis », *Sci. Signal.*, vol. 7, n° 316, p. ra23, mars 2014, doi: 10.1126/scisignal.2004738.
- [163] G. P. McStay, G. S. Salvesen, et D. R. Green, « Overlapping cleavage motif selectivity of caspases: implications for analysis of apoptotic pathways », *Cell Death Differ.*, vol. 15, n° 2, p. 322-331, févr. 2008, doi: 10.1038/sj.cdd.4402260.
- [164] K. R. Parzych et D. J. Klionsky, « An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation », *Antioxid. Redox Signal.*, vol. 20, n° 3, p. 460-473, janv. 2014, doi: 10.1089/ars.2013.5371.
- [165] R. Mathew, V. Karantza-Wadsworth, et E. White, « Role of autophagy in cancer », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 7, n° 12, p. 961-967, déc. 2007, doi: 10.1038/nrc2254.
- [166] R. Ragimbeau, « Etude du rôle de la co-chaperonne BAG6 dans la régulation de la mitophagie », p. 117.
- [167] G. Gunaydin, M. E. Gedik, et S. Ayan, « Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches », *Front. Chem.*, vol. 9, p. 691697, juin 2021, doi: 10.3389/fchem.2021.691697.
- [168] P. Mroz, A. Yaroslavsky, G. B. Kharkwal, et M. R. Hamblin, « Cell Death Pathways in Photodynamic Therapy of Cancer », *Cancers*, vol. 3, n° 2, p. 2516-2539, juin 2011, doi: 10.3390/cancers3022516.
- [169] T. Lazarević, A. Rilak, et Ž. D. Bugarčić, « Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives », *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 142, p. 8-31, déc. 2017, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.04.007.
- [170] N. J. Wheate, S. Walker, G. E. Craig, et R. Oun, « The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials », *Dalton Trans.*, vol. 39, n° 35, p. 8113-8127, août 2010, doi: 10.1039/C0DT00292E.
- [171] Ž. D. Bugarčić, J. Bogojeski, B. Petrović, S. Hochreuther, et R. van Eldik, « Mechanistic studies on the reactions of platinum(ii) complexes with nitrogen- and sulfur-donor biomolecules », *Dalton Trans.*, vol. 41, n° 40, p. 12329, 2012, doi: 10.1039/c2dt31045g.
- [172] B. Therrien et J. Furrer, « The Biological Side of Water-Soluble Arene Ruthenium Assemblies », *Adv. Chem.*, vol. 2014, p. 589686, juill. 2014, doi: 10.1155/2014/589686.
- [173] I. Kostova, « Ruthenium complexes as anticancer agents », *Curr. Med. Chem.*, vol. 13, n° 9, p. 1085-1107, 2006, doi: 10.2174/092986706776360941.
- [174] S. Medici, M. Peana, V. M. Nurchi, J. I. Lachowicz, G. Crisponi, et M. A. Zoroddu, « Noble metals in medicine: Latest advances », *Coord. Chem. Rev.*, vol. 284, p. 329-350, févr. 2015, doi: 10.1016/j.ccr.2014.08.002.
- [175] « Rajaa Farran. Photoinduced electron transfer within heterometallic assemblies of [Ru(bpy)3]2+ linked to bisterpyridine complexes of Fe(II), Co(III) and Cr(III). Inorganic

chemistry. Université Grenoble Alpes, 2015. English. (NNT : 2015GREAS009). (tel-01280950) ».

- [176] J. Mosquera, M. I. Sánchez, M. E. Vázquez, et J. L. Mascareñas, « Ruthenium bipyridyl complexes as photocleavable dimerizers: deactivation of DNA-binding peptides using visible light », *Chem Commun*, vol. 50, n° 75, p. 10975-10978, 2014, doi: 10.1039/C4CC04512B.
- [177] J. Liu, H. Lai, Z. Xiong, B. Chen, et T. Chen, « Functionalization and cancer-targeting design of ruthenium complexes for precise cancer therapy », *Chem. Commun.*, vol. 55, n° 67, p. 9904-9914, 2019, doi: 10.1039/C9CC04098F.
- [178] W. Su *et al.*, « Synthesis, Characterization, and Anticancer Activity of a Series of Ketone-N⁴-Substituted Thiosemicarbazones and Their Ruthenium(II) Arene Complexes », *Inorg. Chem.*, vol. 52, n° 21, p. 12440-12449, nov. 2013, doi: 10.1021/ic401362s.
- [179] A. K. Mishra et L. Mishra, Éd., *Ruthenium chemistry*. Singapore: Pan Stanford Publishing, 2018.
- [180] N. P. E. Barry et P. J. Sadler, « Exploration of the medical periodic table: towards new targets », *Chem. Commun.*, vol. 49, n° 45, p. 5106, 2013, doi: 10.1039/c3cc41143e.
- [181] E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo, et G. Sava, « Ruthenium Antimetastatic Agents », *Curr. Top. Med. Chem.*, vol. 4, n° 15, p. 1525-1535, nov. 2004, doi: 10.2174/1568026043387421.
- [182] S. Y. Lee, C. Y. Kim, et T.-G. Nam, « Ruthenium Complexes as Anticancer Agents: A Brief History and Perspectives », *Drug Des. Devel. Ther.*, vol. Volume 14, p. 5375-5392, déc. 2020, doi: 10.2147/DDDT.S275007.
- [183] B. Therrien et J. Furrer, « The Biological Side of Water-Soluble Arene Ruthenium Assemblies », *Adv. Chem.*, vol. 2014, p. 589686, juill. 2014, doi: 10.1155/2014/589686.
- [184] E. Alessio, « Thirty Years of the Drug Candidate NAMI-A and the Myths in the Field of Ruthenium Anticancer Compounds: A Personal Perspective », *Eur. J. Inorg. Chem.*, vol. 2017, n° 12, p. 1549-1560, 2017, doi: 10.1002/ejic.201600986.
- [185] P. J. Dyson et G. Sava, « Metal-based antitumour drugs in the post genomic era », *Dalton Trans.*, n° 16, p. 1929, 2006, doi: 10.1039/b601840h.
- [186] C. G. Hartinger *et al.*, « KP1019, A New Redox-Active Anticancer Agent – Preclinical Development and Results of a Clinical Phase I Study in Tumor Patients », *Chem. Biodivers.*, vol. 5, n° 10, p. 2140-2155, 2008, doi: 10.1002/cbdv.200890195.
- [187] M. Pernot, « Amélioration de l'efficacité en thérapie photodynamique par couplage d'un photosensibilisateur à des molécules actives », Theses, Université de Lorraine, 2012. Consulté le: 20 septembre 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749609>
- [188] M. Pernot, R. Vanderesse, C. Frochot, F. Guillemin, et M. Barberi-Heyob, « Stability of peptides and therapeutic success in cancer », *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.*, vol. 7, n° 7, p. 793-802, juill. 2011, doi: 10.1517/17425255.2011.574126.
- [189] R. Schneider *et al.*, « Design, synthesis, and biological evaluation of folic acid targeted tetraphenylporphyrin as novel photosensitizers for selective photodynamic therapy »,

- Bioorg. Med. Chem.*, vol. 13, n° 8, p. 2799-2808, avr. 2005, doi: 10.1016/j.bmc.2005.02.025.
- [190] B. Di Stasio *et al.*, « The 2-aminoglucosamide motif improves cellular uptake and photodynamic activity of tetraphenylporphyrin », *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 40, n° 11, p. 1111-1122, nov. 2005, doi: 10.1016/j.ejmech.2005.04.007.
- [191] F. Schmitt, P. Govindaswamy, O. Zava, G. Süß-Fink, L. Juillerat-Jeanneret, et B. Therrien, « Combined arene ruthenium porphyrins as chemotherapeutics and photosensitizers for cancer therapy », *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 14, n° 1, p. 101-109, janv. 2009, doi: 10.1007/s00775-008-0427-y.
- [192] T. Gianferrara *et al.*, « Ruthenium–Porphyrin Conjugates with Cytotoxic and Phototoxic Antitumor Activity », *J. Med. Chem.*, vol. 53, n° 12, p. 4678-4690, juin 2010, doi: 10.1021/jm1002588.
- [193] E. Gullotti et Y. Yeo, « Extracellularly activated nanocarriers: a new paradigm of tumor targeted drug delivery », *Mol. Pharm.*, vol. 6, n° 4, p. 1041-1051, août 2009, doi: 10.1021/mp900090z.
- [194] F. Schmitt, P. Govindaswamy, O. Zava, G. Süß-Fink, L. Juillerat-Jeanneret, et B. Therrien, « Combined arene ruthenium porphyrins as chemotherapeutics and photosensitizers for cancer therapy », *J. Biol. Inorg. Chem. JBIC Publ. Soc. Biol. Inorg. Chem.*, vol. 14, n° 1, p. 101-109, janv. 2009, doi: 10.1007/s00775-008-0427-y.
- [195] S. Swavey et K. J. Brewer, « Visible Light Induced Photocleavage of DNA by a Mixed-Metal Supramolecular Complex: $[(\text{bpy})_2\text{Ru}(\text{dpp})]_2[\text{RhCl}_2]^{5+}$ », *Inorg. Chem.*, vol. 41, n° 24, p. 6196-6198, déc. 2002, doi: 10.1021/ic0257726.
- [196] T. Gianferrara *et al.*, « Synthetic strategies towards ruthenium-porphyrin conjugates for anticancer activity », *Dalton Trans. Camb. Engl.* 2003, n° 48, p. 10742-10756, déc. 2009, doi: 10.1039/b911393b.
- [197] M. Juszczak, M. Kluska, D. Wysokiński, et K. Woźniak, « Anti-cancer properties of ruthenium compounds: NAMI-A and KP1019 », *Postępy Hig. Med. Dośw.*, vol. 74, p. 12-19, févr. 2020, doi: 10.5604/01.3001.0013.8549.
- [198] E. Alessio et L. Messori, « NAMI-A and KP1019/1339, Two Iconic Ruthenium Anticancer Drug Candidates Face-to-Face: A Case Story in Medicinal Inorganic Chemistry », *Molecules*, vol. 24, n° 10, p. 1995, mai 2019, doi: 10.3390/molecules24101995.
- [199] G. Jaouen, Éd., *Bioorganometallics: biomolecules, labeling, medicine*. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.
- [200] G. Süß-Fink, « Areneruthenium complexes as anticancer agents », *Dalton Trans*, vol. 39, n° 7, p. 1673-1688, 2010, doi: 10.1039/B916860P.
- [201] C. G. Hartinger et P. J. Dyson, « Bioorganometallic chemistry—from teaching paradigms to medicinal applications », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, n° 2, p. 391-401, janv. 2009, doi: 10.1039/B707077M.
- [202] M. Gaschard, F. Nehzat, T. Cheminel, et B. Therrien, « Arene Ruthenium Metallacycles with Anthracene Moieties for PDT Applications », *Inorganics*, vol. 6, n° 3, p. 97, sept. 2018, doi: 10.3390/inorganics6030097.

- [203] J.-J. Zhang, S. A. Gamboa, B. J. Davis, et A. Lachgar, « Self-Assembly of Cluster-Based Nanoscopic Supramolecules into One-Dimensional Coordination Polymers », *Adv. Mater. Sci. Eng.*, vol. 2009, p. 1-11, 2009, doi: 10.1155/2009/579123.
- [204] B. Therrien, « Unmasking Arene Ruthenium Building Blocks », *Chem. Rec.*, vol. 21, n° 3, p. 460-468, mars 2021, doi: 10.1002/tcr.202000128.
- [205] M. Gallardo-Villagrán *et al.*, « Evaluation of Ruthenium-Based Assemblies as Carriers of Photosensitizers to Treat Rheumatoid Arthritis by Photodynamic Therapy », *Pharmaceutics*, vol. 13, n° 12, p. 2104, déc. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13122104.
- [206] M. Gallardo-Villagrán, D. Leger, B. Therrien, et B. Liagre, « Photosensitizers Used in the Photodynamic Therapy of Rheumatoid Arthritis », *Int. J. Mol. Sci.*, juill. 2019, doi: 10.3390/ijms20133339.
- [207] M. Gallardo-Villagrán *et al.*, « Ruthenium-based assemblies incorporating tetrapyrrolylporphyrin panels: A photosensitizers delivery strategy for the treatment of rheumatoid arthritis by photodynamic therapy », *Dalton Trans.*, vol. 51, mai 2022, doi: 10.1039/D2DT00917J.
- [208] T. Galliard, D. R. Phillips, et J. A. Matthew, « Enzymic reactions of fatty acid hydroperoxides in extracts of potato tuber. II. Conversion of 9- and 13-hydroperoxy-octadecadienoic acids to monohydroxydienoic acid, epoxyhydroxy- and trihydroxymonoenoic acid derivatives », *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 409, n° 2, p. 157-171, nov. 1975, doi: 10.1016/0005-2760(75)90151-4.
- [209] S. I. Moriwaki, J. Misawa, Y. Yoshinari, I. Yamada, M. Takigawa, et Y. Tokura, « Analysis of photosensitivity in Japanese cancer-bearing patients receiving photodynamic therapy with porfimer sodium (Photofrin) », *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, vol. 17, n° 5, p. 241-243, oct. 2001, doi: 10.1034/j.1600-0781.2001.170507.x.
- [210] J. Usuda *et al.*, « Photodynamic therapy (PDT) for lung cancers », *J. Thorac. Oncol. Off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer*, vol. 1, n° 5, p. 489-493, juin 2006.
- [211] E. Torikai *et al.*, « Photodynamic therapy using talaporfin sodium for synovial membrane from rheumatoid arthritis patients and collagen-induced arthritis rats », *Clin. Rheumatol.*, vol. 27, n° 6, p. 751-761, juin 2008, doi: 10.1007/s10067-007-0794-8.
- [212] A. Hansch *et al.*, « Photodynamic treatment as a novel approach in the therapy of arthritic joints », *Lasers Surg. Med.*, vol. 40, n° 4, p. 265-272, avr. 2008, doi: 10.1002/lsm.20620.
- [213] P. Vaupel, A. Mayer, et M. Höckel, « Tumor hypoxia and malignant progression », *Methods Enzymol.*, vol. 381, p. 335-354, 2004, doi: 10.1016/S0076-6879(04)81023-1.
- [214] M. Hockel et P. Vaupel, « Tumor Hypoxia: Definitions and Current Clinical, Biologic, and Molecular Aspects », *JNCI J. Natl. Cancer Inst.*, vol. 93, n° 4, p. 266-276, févr. 2001, doi: 10.1093/jnci/93.4.266.
- [215] R. Bonnett, B. D. Djelal, et A. Nguyen, « Physical and chemical studies related to the development of m-THPC (FOSCAN®) for the photodynamic therapy (PDT) of tumours », *J. Porphyr. Phthalocyanines*, vol. 5, n° 8, p. 652-661, 2001, doi: 10.1002/jpp.377.
- [216] M. Gallardo-Villagrán, D. Leger, B. Therrien, et B. Liagre, « Photosensitizers Used in the Photodynamic Therapy of Rheumatoid Arthritis », *Int. J. Mol. Sci.*, juill. 2019, doi: 10.3390/ijms20133339.

- [217] M. Gallardo-Villagrán, L. Paulus, Y. Champavier, D. Y. Leger, B. Therrien, et B. Liagre, « Combination of tetrapyridylporphyrins and arene ruthenium(II) complexes to treat synovial sarcoma by photodynamic therapy », *J. Porphyr. Phthalocyanines*, p. A-I, déc. 2021, doi: 10.1142/S1088424622500018.
- [218] M. Gallardo-Villagrán, L. Paulus, Y. Champavier, D. Leger, B. Therrien, et B. Liagre, « Combination of tetrapyridylporphyrins and arene ruthenium (II) complexes to treat synovial sarcoma by photodynamic therapy », *J. Porphyr. Phthalocyanines*, nov. 2021, doi: 10.1142/S1088424622500018.
- [219] C. Lepage, D. Y. Léger, J. Bertrand, F. Martin, J. L. Beneytout, et B. Liagre, « Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells », *Cancer Lett.*, vol. 301, n° 2, p. 193-202, févr. 2011, doi: 10.1016/j.canlet.2010.12.003.
- [220] R. W.-Y. Sun, M. Zhang, D. Li, M. Li, et A. S.-T. Wong, « Enhanced anti-cancer activities of a gold(III) pyrrolidinedithiocarbamate complex incorporated in a biodegradable metal-organic framework », *J. Inorg. Biochem.*, vol. 163, p. 1-7, oct. 2016, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.06.020.
- [221] V. Bogoeva *et al.*, « Ruthenium porphyrin-induced photodamage in bladder cancer cells », *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 14, p. 9-17, juin 2016, doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.01.012.
- [222] F. Schmitt *et al.*, « Ruthenium porphyrin compounds for photodynamic therapy of cancer », *J. Med. Chem.*, vol. 51, n° 6, p. 1811-1816, mars 2008, doi: 10.1021/jm701382p.
- [223] S. Rani-Beeram, K. Meyer, A. McCrate, Y. Hong, M. Nielsen, et S. Swavey, « A Fluorinated Ruthenium Porphyrin as a Potential Photodynamic Therapy Agent: Synthesis, Characterization, DNA Binding, and Melanoma Cell Studies », *Inorg. Chem.*, vol. 47, n° 23, p. 11278-11283, déc. 2008, doi: 10.1021/ic8015589.
- [224] M. Gallardo-Villagrán *et al.*, « Evaluation of Ruthenium-Based Assemblies as Carriers of Photosensitizers to Treat Rheumatoid Arthritis by Photodynamic Therapy », *Pharmaceutics*, vol. 13, p. 2104, déc. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13122104.
- [225] Y. Zhou, X. Liang, et Z. Dai, « Porphyrin-loaded nanoparticles for cancer theranostics », *Nanoscale*, vol. 8, n° 25, p. 12394-12405, 2016, doi: 10.1039/C5NR07849K.
- [226] L. Shi *et al.*, « Encapsulation of Hydrophobic Porphyrins into Biocompatible Nanoparticles: An Easy Way to Benefit of Their Two-Photon Phototherapeutic Effect without Hydrophilic Functionalization », *Cancers*, vol. 14, n° 10, p. 2358, mai 2022, doi: 10.3390/cancers14102358.
- [227] X. Jiang *et al.*, « Self-Assembly of Porphyrin-Containing Metalla-Assemblies and Cancer Photodynamic Therapy », *Inorg. Chem.*, vol. 59, n° 11, p. 7380-7388, juin 2020, doi: 10.1021/acs.inorgchem.9b02775.
- [228] P. Zhao *et al.*, « DNA binding and photocleavage properties of a novel cationic porphyrin-anthraquinone hybrid », *Biophys. Chem.*, vol. 134, n° 1-2, p. 72-83, avr. 2008, doi: 10.1016/j.bpc.2008.01.009.
- [229] R. Kim, « Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy », *Cancer*, vol. 103, n° 8, p. 1551-1560, avr. 2005, doi: 10.1002/cncr.20947.

- [230] W. Li *et al.*, « Ruthenium(II) complexes: DNA-binding, cytotoxicity, apoptosis, cellular localization, cell cycle arrest, reactive oxygen species, mitochondrial membrane potential and western blot analysis », *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 140, p. 94-104, nov. 2014, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2014.07.011.
- [231] K. J. Barnum et M. J. O'Connell, « Cell Cycle Regulation by Checkpoints », in *Cell Cycle Control*, vol. 1170, E. Noguchi et M. C. Gadaleta, Éd. New York, NY: Springer New York, 2014, p. 29-40. doi: 10.1007/978-1-4939-0888-2_2.
- [232] S. Elmore, « Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death », *Toxicol. Pathol.*, vol. 35, n° 4, p. 495-516, juin 2007, doi: 10.1080/01926230701320337.
- [233] X. Li *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.*, vol. 357, n° 1, p. 219-230, févr. 2015, doi: 10.1016/j.canlet.2014.11.026.
- [234] S. L. R. Silva *et al.*, « Ru(II)-thymine complex causes DNA damage and apoptotic cell death in human colon carcinoma HCT116 cells mediated by JNK/p38/ERK1/2 via a p53-independent signaling », *Sci. Rep.*, vol. 9, n° 1, p. 11094, juill. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-47539-0.
- [235] W. Li *et al.*, « In vitro evaluation of ruthenium complexes for photodynamic therapy », *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 18, p. 83-94, juin 2017, doi: 10.1016/j.pdpdt.2017.02.001.
- [236] N.-L. Pan *et al.*, « Lysosome-targeted ruthenium(II) complexes induce both apoptosis and autophagy in HeLa cells », *J. Inorg. Biochem.*, vol. 229, p. 111729, avr. 2022, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2022.111729.
- [237] Y. Lu, T. Shen, H. Yang, et W. Gu, « Ruthenium Complexes Induce HepG2 Human Hepatocellular Carcinoma Cell Apoptosis and Inhibit Cell Migration and Invasion through Regulation of the Nrf2 Pathway », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 17, n° 5, p. E775, mai 2016, doi: 10.3390/ijms17050775.
- [238] B. Peña, S. Saha, R. Barhoumi, R. C. Burghardt, et K. R. Dunbar, « Ruthenium(II)-Polypyridyl Compounds with π -Extended Nitrogen Donor Ligands Induce Apoptosis in Human Lung Adenocarcinoma (A549) Cells by Triggering Caspase-3/7 Pathway », *Inorg. Chem.*, vol. 57, n° 20, p. 12777-12786, oct. 2018, doi: 10.1021/acs.inorgchem.8b01988.
- [239] L. M. Bomfim *et al.*, « Ruthenium(II) complexes with 6-methyl-2-thiouracil selectively reduce cell proliferation, cause DNA double-strand break and trigger caspase-mediated apoptosis through JNK/p38 pathways in human acute promyelocytic leukemia cells », *Sci. Rep.*, vol. 9, n° 1, p. 11483, déc. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-47914-x.
- [240] G.-B. Jiang, Y.-Y. Xie, G.-J. Lin, H.-L. Huang, Z.-H. Liang, et Y.-J. Liu, « Synthesis, characterization, DNA interaction, antioxidant and anticancer activity studies of ruthenium(II) polypyridyl complexes », *J. Photochem. Photobiol. B*, vol. 129, p. 48-56, déc. 2013, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.09.009.
- [241] J. Ferlay *et al.*, « Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods », *Int. J. Cancer*, vol. 144, n° 8, p. 1941-1953, avr. 2019, doi: 10.1002/ijc.31937.

- [242] W. Zhu *et al.*, « Comparison between porphin, chlorin and bacteriochlorin derivatives for photodynamic therapy: Synthesis, photophysical properties, and biological activity », *Eur. J. Med. Chem.*, vol. 160, p. 146-156, déc. 2018, doi: 10.1016/j.ejmech.2018.10.005.
- [243] M. Luo, H. Li, D. Han, K. Yang, et L. Kang, « Inhibition of autophagy enhances apoptosis induced by Ce6-photodynamic therapy in human colon cancer cells », *Photodiagnosis Photodyn. Ther.*, vol. 36, p. 102605, déc. 2021, doi: 10.1016/j.pdpdt.2021.102605.
- [244] L. Xiong *et al.*, « Autophagy inhibition enhances photocytotoxicity of Photosan-II in human colorectal cancer cells », *Oncotarget*, vol. 8, n° 4, p. 6419-6432, janv. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.14117.

Table des illustrations

Figure 1 : Localisation du gros intestin chez l'être humain.....	17
Figure 2 : Organisation du cæcum	18
Figure 3 : Organisation du côlon.....	19
Figure 4 : Organisation de la dernière partie du tube digestif.....	20
Figure 5 : Histologie du côlon	22
Figure 6 : Diverticulose et diverticulite du gros intestin.....	24
Figure 7 : Maladies inflammatoires chroniques du côlon.....	25
Figure 8 : Estimation du nombre de nouveaux cas en 2020, dans le monde, pour les deux sexes, tous âges confondus.	27
Figure 9 : Estimation du nombre de décès en 2020, dans le monde, pour les deux sexes, tous âges confondus.	27
Figure 10 : Estimation du nombre de nouveaux cas en 2020, en France, pour les deux sexes, tous âges confondus.	27
Figure 11 : Estimation du nombre de décès en 2020, en France, pour les deux sexes, tous âges confondus.	27
Figure 12 : Taux d'incidence et de mortalité selon la classe d'âge en France en 2018.....	29
Figure 13 : Dépistage selon le niveau de risque du CCR.....	30
Figure 14 : Polypes adénomateux.....	33
Figure 15 : Polypes non néoplasiques	34
Figure 16 : Diagnostic clinique par toucher rectal (A), Dissémination de la tumeur dans le Mésorectum (B).....	35
Figure 17 : Classification TNM - la lettre " T"	37
Figure 18 : Classification TNM - la lettre " N"	39
Figure 19 : Classification TNM - la lettre " M"	40
Figure 20 : Classification TNM-selon les différents stades	43
Figure 21 : Polypectomie (A) : un stade précoce du cancer ; (B) : polype plus développé	44
Figure 22 : Hémi-colectomie droite, gauche ou transverse du côlon	45
Figure 23 : La colostomie du côlon.....	45
Figure 24 : Principe de la thérapie ciblée dans le traitement du cancer colorectal.....	48
Figure 25 : Thérapie Laser pour le traitement du cancer colorectal.....	51
Figure 26 : Principe de la thérapie photodynamique	52
Figure 27 : Principe des 2 volets de la PDT : la photothérapie et le photodiagnostic	54
Figure 28 : Les trois éléments essentiels de la PDT.....	55

Figure 29 : Processus photochimiques d'activation du PS en présence de lumière	56
Figure 30 : Diagramme de Jablonski illustrant les processus photophysiques possibles.	57
Figure 31 : Illustration schématique des principales transitions et réactions directement impliquées dans les réactions photodynamiques.....	57
Figure 32 : Illustration des transitions électroniques des réactions photodynamiques	58
Figure 33 : Cycle de biosynthèse de l'hème et rôle de la PpIX induite par l'ALA	60
Figure 34 : Propagation de la lumière de différentes longueurs d'onde dans les tissus.	61
Figure 35 : Types de ciblage cellulaires	71
Figure 36 : Morts cellulaires induites par la PDT.....	76
Figure 37 : Effets biologiques induits par le stress oxydatif	77
Figure 38 : Mécanismes de mort cellulaire dépendante de la localisation du PS.....	79
Figure 39 : Mort cellulaire par nécrose ou par apoptose.....	80
Figure 40 : Structure des domaines des caspases humaines	82
Figure 41 : Mécanismes d'activation des caspases	84
Figure 42 : Régulation complexe de l'intégrité de la membrane mitochondriale	85
Figure 43 : La mort cellulaire extrinsèque est médiée par la caspase-8.....	86
Figure 44 : Les différentes formes d'autophagie.....	87
Figure 45 : Effets de la PDT sur les cellules cancéreuses. La PDT peut entraîner l'apoptose, la nécrose ou l'autophagie.	88
Figure 46 : Molécules anticancéreuses à base de platine : cisplatine, carboplatine et oxaliplatine	89
Figure 47 : Structure moléculaire du [Ru(bpy)₃]²⁺.....	90
Figure 48 : Les mécanismes anticancéreux des complexes de Ru	92
Figure 49 : Composés cytotoxiques de Ru NAMI-A et KP 1019	92
Figure 50 : Complexes arène-Ru tétranucléaires conjugués à la porphyrine pour la PDT	94
Figure 51 : Structures moléculaires des assemblages métalliques.....	95
Figure 52 : Structures de cage métallique de Ru(II)	96
Figure 53 : Structure prismatique de cage métallique de Ru(II)	97
Figure 54 : Structure cubique de cage métallique de Ru(II).....	98
Figure 55 : Structure d'un complexe tétrapyrrolylporphyrine fonctionnalisé avec arène-Ru.	99
Figure 56 : Cage métallique de Ru contenant du TPyP	100
Figure 57 : Cage métallique de Ru contenant du Zn-TPyP	100
Figure 58 : Effets photocytotoxiques de la TPyP-arène-Ru sur les cellules HCT116 à 24 et 48h.	112
Figure 59 : Effets photocytotoxiques de la Zn-TPyP-arène-Ru sur les cellules HCT116 à 24 et 48h.	113

Figure 60 : Effets photocytotoxiques de la TPyP-arène-Ru sur les cellules HT-29 à 24 et 48h.	114
Figure 61 : Effets photocytotoxiques de la Zn-TPyP-arène-Ru sur les cellules HT-29 à 24 et 48h.	115
Figure 62 : Dosage des ERO dans les cellules HT-29	116
Figure 63 : Etude de la localisation cellulaire de la TPyP-arène-Ru par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® dans les cellules HCT116.	118
Figure 64 : Etude de la localisation cellulaire de la Zn-TPyP-arène-Ru par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® dans les cellules HCT116.	119
Figure 65 : Etude de la localisation cellulaire de la TPyP-arène-Ru par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® dans les cellules HT-29.	120
Figure 66 : Etude de la localisation cellulaire de la Zn-TPyP-arène-Ru par cytométrie en flux couplée à l'analyse d'images AMNIS® dans les cellules HT-29.	121
Figure 67 : Etude de l'internalisation cellulaire de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru par microscopie confocale.	122
Figure 68 : Etude du marquage des organites cellulaires par microscopie confocale.	122
Figure 69 : Etude de la co-localisation cellulaire de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru par microscopie confocale.	123
Figure 70 : Effets des deux composés et/ou de la PDT sur la répartition des cellules HCT116 dans les phases du cycle cellulaire.	124
Figure 71 : Effets des deux composés et/ou de la PDT sur la répartition des cellules HT-29 dans les phases du cycle cellulaire.	125
Figure 72 : Etude du niveau d'apoptose dans les cellules HCT116 à 24h.	126
Figure 73 : Etude du niveau d'apoptose dans les cellules HCT116 à 48h.	127
Figure 74 : Etude du niveau d'apoptose dans les cellules HT-29 à 24h.	128
Figure 75 : Etude du niveau d'apoptose dans les cellules HT-29 à 48h	129
Figure 76 : Analyse quantitative des caspases-3/-7 activées dans les cellules HCT116 sur 48h	130
Figure 77 : Analyse quantitative des caspases-3/-7 activées dans les cellules HT-29 sur 48h	131
Figure 78 : Effets des composés et/ou de la PDT sur l'expression protéique de marqueurs apoptotiques dans les cellules HCT116 à 24h.	132
Figure 79 : Effets des composés et/ou de la PDT sur l'expression protéique de marqueurs apoptotiques dans les cellules HCT116 à 48h.	133
Figure 80 : Effets des composés et/ou de la PDT sur l'expression protéique de marqueurs apoptotiques dans les cellules HT-29 à 24h.	133
Figure 81 : Effets des composés et/ou de la PDT sur l'expression protéique de marqueurs apoptotiques dans les cellules HT-29 à 48h	134
Figure 82 : Effets des composés et/ou de la PDT sur l'expression de protéines pro- et anti-apoptotiques dans les cellules HCT116 à 24h.	135

Figure 83 : Effets des composés et/ou de la PDT sur l'expression de protéines pro- et anti-apoptotiques dans les cellules HCT116 à 48h.	135
Figure 84 : Effets des composés et/ou de la PDT sur l'expression de protéines pro- et anti-apoptotiques dans les cellules HT-29 à 24h.	136
Figure 85 : Effets des composés et/ou de la PDT sur l'expression de protéines pro- et anti-apoptotiques dans les cellules HT-29 à 48h.	136
Figure 86 : Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN dans les cellules HCT116 à 24h	137
Figure 87 : Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN dans les cellules HCT116 à 48h	138
Figure 88 : Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN dans les cellules HT-29 à 24h.	139
Figure 89 : Analyse quantitative de la fragmentation de l'ADN dans les cellules HT-29 à 48h.	139
Figure 90 : Bilan des effets de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru photoactivées dans les cellules cancéreuses colorectales. Créé par J.M via Biorender.com	150

Table des tableaux

Tableau 1 : Les indicateurs de la lettre "T"	38
Tableau 2 : Les indicateurs de la lettre "N"	39
Tableau 3 : Les indicateurs de la lettre "M"	40
Tableau 4 : Classification du cancer colorectal selon les stades	42
Tableau 5 : Exemple de porphyrine utilisée contre le cancer.	63
Tableau 6 : Exemples de PS de deuxième génération.....	64
Tableau 7 : Exemple de PS ciblés de troisième génération.	65
Tableau 8 : Exemple de PS nanovectorisés de la troisième génération.....	66
Tableau 10 : Exemples de photosensibilisateurs synthétiques	68
Tableau 11 : Exemples de PS inorganiques.....	69
Tableau 12 : Exemples de PS inorganiques.....	108
Tableau 13 : Valeurs d'IC50 (nM) déterminées sur les cellules HCT116.	114
Tableau 14 : Valeurs d'IC50 (nM) déterminées sur les cellules HT-29	115
Tableau 15 : Pourcentage de co-localisation des deux complexes dans les cellules HCT116.	117
Tableau 16 : Pourcentage de co-localisation des deux complexes dans les cellules HT-29.	119

Publication

Photodynamic therapy in colorectal cancer using photosensitizers functionalized by arene-ruthenium complexes

Jacquie MASSOUD¹, Aline PINON¹, Manuel GALLARDO-VILLAGRAN^{1,2}, Lucie PAULUS¹,
Sayed ANTOUN³, Mona DIAB-ASSAF⁴, Bruno THERRIEN^{2*} and Bertrand LIAGRE^{1*}

¹ Univ. Limoges, LABCiS, UR 22722, Faculté de Pharmacie, F-87000 Limoges, France.

² Institute of Chemistry, University of Neuchâtel, Avenue de Bellevaux 51, CH-2000 Neuchâtel, Switzerland

³ Department of Chemistry and Biochemistry, Lebanese University, Lebanon

⁴ Doctoral School of Sciences and Technology, Lebanese University, Hadath El Jebbeh, Beyrouth 21219, Lebanon

† These authors contributed equally to the work.

* Corresponding author: Pr B. Liagre, bertrand.liagre@unilim.fr

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is one of the most frequently diagnosed cancers worldwide and one of the main causes of cancer deaths in the global population. First-line treatment usually includes surgical procedures followed by combination chemotherapy. Despite the improvements in CRC treatments, the mortality rate remains very high, leading consequently to conventional treatment resistance. Several therapies were enrolled to this content in a way to find the best solutions for this disease. Photodynamic therapy (PDT) using photosensitizers (PS) presents itself as an original innovative therapeutic strategy that strongly limits the undesirable side effects of conventional treatment. However, low physiological solubility and a lack of selectivity of PS towards tumor sites are the principal restrictions of their current clinical use. Indeed, drug delivery systems are currently a key issue in cancer therapy. To overcome the problem of solubility and stability of PS such as porphyrins and their derivatives, metallic assemblies based on arene-ruthenium (Ru) units have begun to attract considerable attention as PS delivery systems. The purpose of this study was to demonstrate firstly the interest in the vectorization of tetrapyrrolylporphyrin (TPyP-arene-Ru) and Zn-tetrapyrrolylporphyrin arene-ruthenium (Zn-TPyP-arene-Ru) metallacages to increase their solubility in biological media and then, consequently their anticancer efficacy in PDT. Secondly, to elucidate the anticancer mechanism as well as identify the cell death process mediated by these new vectorized PS. The results showed that the two PS-arene-Ru complexes have a strong photocytotoxic effect after photoactivation on human HCT116 and HT-29 colorectal cancer cell lines. TPyP-arene-Ru-PDT induced outstanding cytotoxicity when compared to the Zn-TPyP-arene-Ru analogue. The two complexes show no significant effect on proliferation in the dark. In addition, results demonstrated that these two PS-arene-Ru complexes-PDT induce an apoptotic process through the appearance of a sub-G1 peak, phosphatidylserines externalization, poly-ADP ribose polymerase (PARP) cleavage and DNA fragmentation. Thus, our data contribute to highlighting that the incorporation of porphyrins in Ru-based assemblies could be an efficient vectorized system to treat CRC by PDT.

Keywords: Colorectal cancer, Photodynamic therapy, Apoptosis, Porphyrin, Arene ruthenium

1

1. Introduction

Cancer is a group of diseases that refer to abnormal cell division leading to uncontrolled cell growth and proliferation. When this type of growth occurs in the colon or rectum, this disease is defined as colorectal cancer (CRC) [1]. In 2022, the World Health Organization (WHO) and the International Agency for Research on Cancer (IARC) estimate that in 2020, CRC is the third most common cancer worldwide with approximately 1.9 million cases annually and the second leading of death for oncological reasons globally with 900 000 deaths [2,3]. CRC mainly originate from a benign tumor or adenomatous polyp that evolves into a dangerous malignant tumor [4]. The passage from a benign tumor to a malignant one is characterized by the capacity of the cells to infiltrate the different histological layers of the organ [5]. The most dangerous stage is the metastatic stage when the cancer cells have acquired the ability to detach from the initial tumor and invade other organs, through the blood or lymph, and create a secondary tumor [6]. Today, CRC is at a crossroads, strategies used to treat it involve many conventional and advanced scientific methods. These therapies incorporate surgery/polypectomy, radiation therapy, chemotherapy, combination therapies, and targeted therapy [7-9]. Unfortunately, these methods are not sufficient for the complete treatment of CRC. Researchers have tried to provide advanced alternative approaches to deal with conventional methods' drawbacks and combat CRC resistance to conventional treatments [10]. 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 their toxicity on healthy tissues make it imperative to find other methods for CRC therapy.

Photodynamic therapy (PDT) has attracted widespread attention in recent years as a non-invasive and highly selective approach for cancer treatment precisely for CRC. The molecular mechanism of PDT involves the photoactivation of a photosensitizer (PS) by an appropriate wavelength of light in presence of oxygen molecules in the tumor environment [11-13]. In effect, PDT exploits the potency of visible light to deliver cytotoxic agents in a spatially and temporally controlled manner to directly damage the targeted tumor cells and tissues [14,15]. PDT is mainly targeted toward the generation of reactive oxygen species (ROS) which are involved in cell toxicity [12,16,17]. To occur photodynamic photochemical reactions, the PS must absorb at least one photon to be promoted to a sufficiently long-lived excited state and then induce photodynamic reactions in an oxygenated environment [18]. Under the effect of light irradiation, the PS is activated and goes from the ground state to an excited one [19,20]. At this stage, the PS is very unstable and loses its excess energy either directly or via the excited triplet state [21]. The excited triplet will slowly return to the ground state by photochemical reactions of type I or II. Both reactions may take place simultaneously being their kinetics strongly favored by the oxygen, substrate concentration, and type of the PS. In type I reaction, the free radicals may further react with oxygen to produce ROS [22,23]. Superoxide anion initially produced via type I pathway by monovalent reduction does not cause oxidative damage but reacts with itself to generate oxygen and hydrogen peroxide. However, in type II reaction, the excited PS transfers its energy directly to molecular oxygen to form singlet oxygen. These highly cytotoxic ROS can oxidize a variety of biomolecules, inducing an acute stress response and triggering a series of redox signaling pathways, frequently leading to cell death [24-26].

Currently, the most widely PS used in PDT are the tetrapyrrole derivate such as porphyrins, chlorines, bacteriochlorines, and phthalocyanines. Nevertheless, the main inconveniences of

these PS are their low water solubility, which limits intravenous administration, their poor photophysical properties due to PS aggregation, and their low tumor selectivity, limiting consequently their use in clinical trials [27]. Constantly, the most important aim of the research today is to find the best PS, overcome their solubility problems, and improve their effectiveness in PDT.

The reactivity and interactions theory between metal complexes and biomolecules such as DNA and proteins has made them the center of interest for therapeutic purposes. Unfortunately, this type of drug has shown significant side effects, which has led to the search for new, less toxic anticancer agents [28]. Ruthenium (Ru) complexes with polypyridyl ligands have received much attention due to their interesting properties [29,30]. These properties lead to their potential use in various fields such as PS for photochemical conversion and precisely as photoactive DNA cleavage agents for therapeutic purposes. Porphyrins and their derivatives are one of the outstanding PS conjugated to Ru [31,32]. Indeed, the conjugation of porphyrins to peripheral metal moieties is an interesting strategy for the development of compounds that may combine the cytotoxicity of the metal moiety with the phototoxicity of the porphyrin chromophore for additive antitumor effects [33,34]. To circumvent the problem of solubility and stability of Ru-based PS, metal assemblies have begun to attract considerable interest [35]. These molecular assemblies have been used to generate an isolated environment for PS as encapsulation systems and protect it as guest, sensitive or unstable molecules. These assemblies are known as "host-guest" systems [36]. Our collaborators Gallardo-Villagrán et al. reported by several studies that the poor solubility of some PS could be solved by using arene-Ru-based metallacages as carriers in two different ways [37]. The first type refers to a prismatic metallacages, which can improve the solubility of these organometallic complexes in biological media, likewise, they can entertain PS as guest in their internal cavities, transporting and releasing them into the target cells [38]. The second type of this vectorization system is cubic metallacages. The specificity of these metallacages relies on the integration of the PS into the initial structure of the metallacages, which maintains an excellent physiological solubility and keeps the PS available to be irradiated at any time [39].

In the ongoing study, we focused on the evaluation of the anticancer efficacy of the cubic arene-Ru metallacages carrying on their own structure two units of PS based on tetrapyrrolylporphyrin (TPyP) as an interesting vectorization system. In addition, to demonstrate a possible metal influence on the photoactivity of the PS, we examined the presence of diamagnetic metal (Zn^{2+}) in the center of the tetrapyrrole ring in the TPyP panels ($Zn-TPyP$). In such a way, we verified whether the photoactivity of the PS has been modified or not when it is part of a metal assembly. Firstly, we investigate the anticancer effect of the functionalized TPyP and $Zn-TPyP$ with arene-Ru complexes on human HCT116 and HT-29 colorectal cancer cell lines. Then, for purpose of understanding the cell death process involved in this therapy, we examined the cell cycle distribution, phosphatidylserines externalization, as well as poly-ADP ribose polymerase (PARP) cleavage, and DNA fragmentation. Subsequently, consistent with other PDT studies, our results demonstrated that TPyP and $Zn-TPyP$ -arene-Ru complexes (Figures 1 and 2) achieve their anticancer effects through the apoptotic process.

2. Material and Methods

2.1. 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), cell death detection enzyme-linked immunosorbent assay ^{PLUS} (ELISA) and human anti- β -actin antibody were obtained from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, France). Poly-ADP-ribose polymerase (PARP) antibody and goat anti-rabbit IgG secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (HRP) were acquired from Cell Signaling Technology-Ozyme (Saint-Quentin-en-Yvelines, France). Rabbit anti-mouse IgG-IgM H&L HRP secondary antibody, 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).

2.2. Cell culture and treatment

Human CRC cell lines HT-29 and HCT116 were purchased from the American Type Culture Collection (ATCC-LGC Standards, Mosheim, France). Cells were grown in DMEM medium for HT-29 cells and RPMI 1640 medium for HCT116 cells. Culture mediums were supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine and 100 U/mL penicillin, and 100 μ g/mL streptomycin. Cultures were maintained in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ at 37°C. For all experiments, cells were seeded at 2.1×10^4 , 1.2×10^4 cells/cm² for HT-29 and HCT116 cells respectively and the culture medium was replaced by a red phenol-free appropriate culture medium before PDT.

TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru complexes were prepared as previously described [40-42]. Ru (III) chloride hydrate, 1-isopropyl-4-methylcyclohexane-1,4-diene, 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)-21*H*,23*H*-porphine and zinc 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)-21*H*,23*H*-porphine were acquired from Sigma-Aldrich. Stock solutions of PS-arene-Ru complexes were dissolved at 1 mM in DMSO, then were diluted in culture medium to obtain the appropriate final concentrations just before use. The concentration of DMSO in culture medium was lower than 0.1% in all cases.

2.3. Phototoxicity of TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru complexes

Phototoxicity was determined using an MTT assay. Briefly, cells were seeded in 96-well culture plates and grown for 36h in an appropriate culture medium before exposure or not to TPyP or Zn-TPyP-arene-Ru complexes. After 24h incubation, cells were irradiated or not with a 630-660 nm CURElight lamp at 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). MTT assays were performed 24 and 48h post-irradiation and cell viability was expressed as a percentage of each treatment condition by normalizing to untreated cells.

2.4. Cell cycle analysis

The cell cycle distributions in colorectal HT-29 and HCT116 cell lines were analyzed by flow cytometry using propidium iodide (PI) staining. For each cell line, cells were treated or not with the determined IC₅₀ values of TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru for 24 and 48h, then harvested with trypsin. For flow cytometry analysis, 1.5×10^6 cells of each condition were collected, washed

with PBS, and fixed by adding 1 mL of chilled 70% ethanol in PBS and stored at -20°C. Following fixation, cells were pelleted, washed in cold PBS, resuspended in 500 mL of cold PBS containing 30 µL of RNase A (10 mg/mL), and incubated for 30 min at room temperature. After staining with 25 µL of PI, the percentage of cells in each stage of the cell cycle was determined using the FACS system (BD Biosciences, San Jose, CA). All the experiments were performed on three samples.

2.5. Apoptosis by TPYP and Zn-TPYP-arene-Ru-PDT

2.5.1. Annexin V-FITC/PI dual staining assay

The Annexin V-FITC/PI dual staining assay was used to determine the percentage of apoptotic cells. For each cell line, cells were treated or not with the determined IC₅₀ values of TPYP and Zn-TPYP-arene-Ru for 24 and 48h and then harvested with trypsin. 2.5×10⁵ cells of each condition were collected, washed in PBS, centrifuged, and resuspended in 100 µL binding buffer (1X) containing 5 µL of Annexin V-FITC and 1 µL of PI (0.1 mg/mL) at room temperature in the dark. After 15 min incubation, cells were analyzed for the percentage undergoing apoptosis using the FACS system (BD Biosciences). All the experiments were performed on three samples.

2.5.2. Protein extraction and western blot analysis

For each cell line, cells were treated or not with the determined IC₅₀ values of TPYP and Zn-TPYP-arene-Ru for 24 and 48h and then harvested with trypsin. For total protein extraction, collected samples of each condition were washed in PBS. Then, the total cell pool was centrifuged at 200 g for 5 min at 4°C and homogenized in RIPA lysis buffer (50 mM HEPES, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1% sodium deoxycholate, 1% NP-40, 0.1% SDS, 20 mg/mL of aprotinin) containing protease inhibitors according to the manufacturer's instructions as previously described [43]. The protein level was determined using the Bradford method. Proteins (60 µg) were separated on 12.5% SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes (Amersham Pharmacia Biotech, Saclay, France). Membranes were probed with respective human antibodies against PARP and β-actin used as a loading control, according to the manufacturer's instructions. After incubation with appropriate secondary antibodies, blots were developed using the "Immobilon Western" substrate following the manufacturer's protocol and G: BOX system (Syngene, Ozyme).

2.5.3. Apoptosis quantification: DNA fragmentation

For each cell line, cells were treated or not with the determined IC₅₀ values of TPYP and Zn-TPYP-arene-Ru for 24 and 48h and then harvested with trypsin. Histone release from the nucleus during apoptosis was analyzed using the Cell Death Detection ELISA^{PLUS} as previously described [44]. 2×10⁵ cells of each condition were obtained and DNA fragmentation was measured according to the manufacturer's protocol.

2.5.4. 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.

3. Results

3.1. Phototoxic effect of TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru

To investigate the *in vitro* phototoxicity of TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru, we treated or not two human CRC cell lines: HCT116 and HT-29 with TPyP or Zn-TPyP-arene-Ru complexes. Then, the cells were exposed or not to PDT with red irradiation and phototoxic effects were determined 24 and 48h post-irradiation using the MTT assay. Results showed that PS-arene-Ru complexes had no toxic effect on HCT116 and HT-29 cell lines when the cells were kept in the dark. Forwards PDT activation, results revealed that both TPyP and Zn-TPyP-arene complexes leads to a drastic decrease in cell viability in a dose-dependent manner (Figures 3 and 4). However, TPyP-arene-Ru complex was more effective than the Zn-TPyP analogue on both cell lines.

IC₅₀ values were determined to compare the impact of adding a diamagnetic metal (Zn²⁺) to the center of the tetrapyrrole ring in TPyP panels after activation with PDT. We observed that TPyP-arene-Ru was much more effective than Zn-TPyP-arene-Ru in the HCT116 cell line with 8-fold more cytotoxicity at 24h (Figure 3A and 3B). IC₅₀ values were in range of 41.89 nM for TPyP-arene-Ru and 331.23 nM for Zn-TPyP-arene-Ru. Our compounds revealed more cytotoxicity at 48h where IC₅₀ values decreased to 35.24 nM for TPyP-arene-Ru and 207.45 nM for Zn-TPyP-arene-Ru (Figure 3, Table 1).

Similar results were noted for the HT-29 cell line that showed more resistant than HCT116 as their respective IC₅₀ values were 67.82 nM for TPyP-arene-Ru and 393.89 nM for Zn-TPyP-arene-Ru at 24h (Figure 4A and 4B). These values decreased to be respectively 54.10 nM for TPyP-arene-Ru and 379.29 nM for Zn-TPyP-arene-Ru at 48h (Figure 4, Table 2).

The compounds were considered at the determined IC₅₀ values for the following experiments.

3.2. TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru effect on cell cycle

PDT can induce irreversible photodamage leading to cell death. To define the cell death process triggered by our compounds and to confirm that the viability reduction in the two CRC cell lines studied was due to the photoactivation of TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru complexes by PDT, we decided to verify the changes in the cell cycle induced by this photoactivation.

HCT116 and HT-29 cells were treated or not with the determined IC₅₀ values of TPyP or Zn-TPyP-arene-Ru complexes and then subjected to flow cytometry analysis using PI staining after PDT. Results showed that on HCT116 cells TPyP-arene-Ru induced a strong increase in the number of apoptotic cells represented by the sub-G1 peak mainly at 48h within 33.83% vs 0.65% for control. In contrast, Zn-TPyP-arene-Ru was shown to have less effect on sub-G1 cells with 5.29% vs 0.65% for control at 48h (Figure 5). Similar results were observed for HT-29 cells where TPyP-arene-Ru produced an increase in the number of apoptotic cells as appeared by a sub-G1 peak with 9.04% vs 1.22% for the control at 24h. Likewise, we observed a drastic increase at 48h with a 28.30% sub-G1 peak vs 1.22% for the control (Figure 6). It is important to note that our two complexes have no influence on the cell cycle in the dark in both cell lines tested.

3.3. TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru induce apoptosis

Cell cycle analysis of HCT116 and HT-29 cells treated with either TPyP or Zn-TPyP-arene-Ru revealed the appearance of a sub-G1 population referring to cells in apoptosis. Therefore, we have studied the mechanism of apoptosis induced by TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru complexes on HCT116 and HT-29 cells 24 and 48h post-PDT. The apoptotic process was first investigated using annexin V-FITC/PI dual staining assay. During the early stages of apoptosis, phosphatidylserines are known for their translocation from the inner to the outer plasma membrane of the cell, thus, phosphatidylserines externalization allows it to bind with annexin V. Therefore, the percentages of apoptotic cells at early and later stages were determined by dual staining with Annexin V-FITC and PI by flow cytometry. Results showed that in HCT116 cells, control, light control, TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru treated cells were mostly viable, whereas the cumulative rate of early and late apoptosis was 11.31%, 11.29%, 9.79%, and 10.23% respectively at 24h. This rate has increased dramatically with the conjugation of irradiation to be 49.25% for TPyP-arene-Ru-PDT more effective than Zn-TPyP-arene-Ru-PDT with 21.58%. Same as for 48h after PDT, TPyP-arene-Ru and Zn-TPyP-arene-Ru caused 61.46% and 42.38% of apoptosis respectively compared to 12.96% for control, 15.24% for light control, 16.22% for TPyP-arene-Ru and 22.4% for Zn-TPyP-arene-Ru complexes without photoactivation (Figure 7).

HT-29 cells showed to be less sensitive than HCT116 cells. At 24h, control, light control, TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru treated cells revealed as expected a high viability percentage with apoptosis total rate of 6.7%, 8.02%, 8.38%, and 7.29%. However, when TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru complexes were photoactivated, they increase the cumulative rate of early and late apoptosis to 35.45% and 22.8% respectively. In addition, 48h post-irradiation, TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru complexes strongly increased the apoptosis rate to 58.31% and 36.82% respectively. Control, control light, TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru complexes showed 13.44%, 12.92%, 10.67% and 13.07% as total apoptosis rate (Figure 8).

3.4. TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru induce DNA damage in CRC cells

To prove the role of TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru-PDT on apoptosis, other investigations on later stages of this process had to be evaluated. Here, we were interested in the state of the poly-ADP-ribose polymerase (PARP). PARP is an enzyme engaged in DNA repair. Cleavage of PARP is considered as a hallmark of cells undergoing apoptosis. We compared the expression of native and cleaved PARP forms in treated and untreated cells using Western blotting. After PDT, results showed that TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru induced PARP cleavage as shown by the highly apparent 89 kDa cleavage fragment for HCT116 (Figures 9B and 10B) and HT-29 (Figures 11B and 12B) cell lines, associated with a decreased expression of the native PARP in treated cells compared to control at 24 and 48h.

Furthermore, to study the nuclear changes in apoptosis caused by TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru treatments with PDT, DNA fragmentation was evaluated by ELISA assay in both cell lines at 24 and 48h. The outcomes indicate that in HCT116 cells, TPyP-arene-Ru leads to a significant increase in DNA fragmentation by 3.68-fold at 24h and 5.57-fold at 48h compared to non-irradiated conditions 1.31-fold and 0.82-fold respectively compared to control. Similarly, Zn-TPyP-arene-Ru coupled with PDT increased DNA fragmentation by 2.36-fold and 1.19-fold at 24 and 48h respectively compared to non-irradiated conditions 1.38-fold and 0.70-fold compared to control (Figures 9A and 10A).

7

HT-29 showed similar results, TPyP-arene-Ru coupled with PDT induce a significant increase in DNA fragmentation by 3.34-fold at 24h and 5.41-fold at 48h, whereas the non-irradiated condition showed no significant effect with 1.31-fold and 0.82-fold respectively compared to control. Likewise, Zn-TPyP-arene-Ru with PDT increased DNA fragmentation mainly at 48h by 1.86-fold compared to non-irradiated condition 0.98-fold compared to control (Figures 11A and 12A).

4. Discussion

PDT is an innovative cancer therapy that offers advantages over conventional treatments. Nevertheless, despite its potential advantages, only a small number of PS are approved like porphyrin-types. This type of PS is useless by itself due to its low solubility in biological media, but when incorporated into metallizations, it can be internalized into cells. Based on this theory the conjugation of porphyrin with metals has received much attention [45].

Recent scientific studies showed that ruthenium complexes are one of the most interesting metal-based drugs used in the treatment of several cancers such as colon cancer [29,46]. Porphyrin and its derivatives are one of the most important Ru-conjugated PSs. The interesting properties of Ru complexes have led to their potential use in various fields such as PS and photoactive DNA cleavage agents for therapeutic purposes [47]. Recently, the attempt to find alternative approaches to enhance the specificity and selectivity of drug delivery to cancer cells has received a great deal of attention [35]. To overcome the solubility and stability problems of Ru-based PS, metal assemblies have begun to receive considerable interest, as drug encapsulation carriers [48-50].

Several studies reported that porphyrin-Ru complexes had significant anticancer effects. Bogoeva et al. reported Ru porphyrin-induced photodamage in bladder cancer cells [51]. In addition, Schmitt et al. demonstrated that five 5,10,15,20-tetra(4-pyridyl)porphyrin (TPP) arene Ru (II) derivatives and a p-cymeneosmium and two pentamethylcyclopentadienyliridium exhibited excellent phototoxicities toward melanoma cells when exposed to laser light at 652 nm [41]. Cellular uptake and localization microscopy studies of $[\text{Ru}(\eta^6\text{-C}_6\text{H}_5\text{CH}_3)_2(\text{TPP})\text{Cl}_2]$ and $[\text{Rh}(\eta^5\text{-C}_5\text{Me}_5)_2(\text{TPP})\text{Cl}_2]$ revealed that they accumulated in the melanoma cell cytoplasm in granular structures different from lysosomes. Another study provided by Rani-Beeram et al. established that fluorinated Ru porphyrin presented a strong DNA interaction that leads to its cleavage in melanoma cells [52]. Most recently we reported that in cubic or prismatic cage can serve as an ideal carrier for PS to treat rheumatoid arthritis [37]. Furthermore, we demonstrated in another study that the combination of tetrapyrrolylporphyrin and arene Ru (II) complexes plays a crucial role as a PDT-conjugated anticancer agent for the treatment of synovial sarcoma [53].

In the current study, we are the first to use TPyP-arene-Ru cubic metallacages to treat CRC. We wanted to demonstrate the potential of these cages as a drug delivery system for tetrapyrrolylporphyrin PS. For this purpose, we evaluated the effect of TPyP-arene-Ru complex associated with PDT on two human CRC cell lines HCT116 and HT-29. As we explained before, our cages contain metal-ligand so to evaluate the effect of metal on our PS, a diamagnetic metal (Zn^{2+}) was introduced in the center of the tetrapyrrole ring in the TPyP panels (Zn-TPyP).

First of all, we evaluated the photocytotoxicity of TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru, and we demonstrated that both structures have a dramatic significant cytotoxic effect on the two CRC cell lines studied. This result was expected due to the distinct structure of these cages containing two units of tetrapyrrolylporphyrin as PS, which has the effect of strengthening the effectiveness of the treatment and consequently allows us to reduce the dose necessary to obtain a better therapeutic effect. TPyP-arene-Ru has shown to induce remarkable cytotoxicity by 5 to 8-folds when compared to the Zn-tetrapyrrolylporphyrin analog on both cell lines. We can relate this to the higher fluorescence of PS with a metallic center. This occurs because when the PS is irradiated it causes its excitation, that is, it absorbs part of the irradiation energy and reaches a higher energy state (excited singlet state). Fluorescence is a consequence of the energetic decay from the excited state of the PS to the minimum energy state. Therefore, high fluorescence quantum yield (Φ_F) suggests that much of the energy in the singlet excited state of the PS returns to the ground state without passing through the triplet excited state. Consequently, generating more fluorescence but leaving behind less energy in the triplet state to interact with O_2 and give rise to ROS leading to cell death which decreases the treatment efficacy. However, in all cases, we systematically obtained a significant cytotoxic effect for which the determined IC_{50} values are very low, in the nanomolar range. Secondly, another interesting result, we demonstrated that tested metallacages have no cytotoxic effect in the dark even with very high concentrations. These results can confirm that these two complexes can be ideal PS for PDT and these cages can give rise to significant differences in PDT effects.

Inhibition of cancer cell proliferation by cytotoxic drugs could be the result of induction of apoptosis or cell cycle arrest or a combination of both processes [54]. We investigated the possible cell growth mechanism inhibition by flow cytometry analysis. We demonstrated that TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru coupled with PDT led to marked increases in the proportion of apoptotic cells, as reflected by the sub-G1 peaks. Whereas, both complexes have no significant effect on cell cycle phases, which can affirm that cell growth inhibition does not depend on cell cycle arrest [55]. In order, to evaluate the induction of apoptosis mechanism leading to cell death, we investigated the percentage of phosphatidylserines externalization of apoptotic cells by annexin-V-FITC/PI dual staining assay by flow cytometry. We established that photoactivation of TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru increased dramatically the cumulative rate of early and late apoptosis which can confirm cell death via apoptosis. These results are in agreement with a study held by Silva et al. reporting the apoptotic cell death in human colon carcinoma HCT116 cells treated with Ru(II)-thymine complex [56]. Furthermore, to validate the apoptotic mechanism, we evaluated the last stage in the death mechanism related to DNA fragmentation, we demonstrated that TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru coupled with PDT induced significant PARP cleavage and DNA fragmentation. This result can be related to the strong potential of Ru complexes' photophysical, photochemical properties that allow them to bind to DNA and induces its cleavage by photoactivation [57]. These demonstrated results agree with Lu et al. study which reports the anticancer effect of Ru complexes on hepatocellular carcinoma [58].

5. Conclusion

In this study, we evaluated for the first time the anticancer efficacy of the TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru metal assemblies on two human CRC cell lines HCT116 and HT-29. Following our

hypothesis concerning the interest in porphyrin delivery, we demonstrated the strong *in vitro* anticancer efficacy of TPyP and Zn-TPyP-arene-Ru complexes coupled with PDT. Our results showed significant phototoxicity of both metallacages with a more remarkable effect for the devoid of the metal in its tetrapyrrole ring center. The results confirm cell death via the apoptotic pathway. These metal assemblies have proven to be ideal delivery systems for porphyrin-based PS giving a great advantage as a new therapeutic agent for anti-cancer PDT.

Author Contributions: Conceptualization, J.M, B.L.; Methodology, J.M., A.P., L.P.; Validation, B.L., Writing original draft preparation, J.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgments: Authors are grateful to the BISCEm platform of Ω Health Institute at Limoges University especially Catherine OUK with assistance for flow cytometry analysis.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviation list:

ATCC: American Type Culture Collection / **CO₂:** Carbon dioxide / **CRC:** colorectal cancer / **DMEM:** Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium / **DMSO:** Dimethyl sulfoxide / **DNA:** deoxyribonucleic acid / **FBS:** Fetal Bovine Serum / **ΦF:** Fluorescence Quantum Yield / **HEPES:** 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid / **H₂O₂:** Hydrogen peroxide / **HRP:** Horseradish Peroxidase / **IARC:** International Agency for Research on Cancer / **IC₅₀:** median inhibiting concentration / **kDa:** kilodalton / **MTT :** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide / **NaCl:** sodium chloride / **¹O₂:** singlet oxygen / **PARP:** Poly-ADP-ribose polymerase / **PBS:** Phosphate-buffered saline / **PDT:** Photodynamic therapy / **PI:** Propidium Iodide / **PS:** photosensitizer / **PVDF membrane :** polyvinylidene fluoride membrane / **RIPA:** Radio immuno precipitation Assay / **ROS:** reactive oxygen species / **RPMI:** Roswell Park Memorial Institute medium / **Ru:** Ruthenium / **SDS-PAGE:** electrophoresis in polyacrylamide gel containing sodium dodecyl sulfate / **SEM:** Standard Error of the Mean / **TPyP:** Tetrapyrrolyporphyrin / **WHO:** World Health Organization / **Zn:** Zinc.

Figures

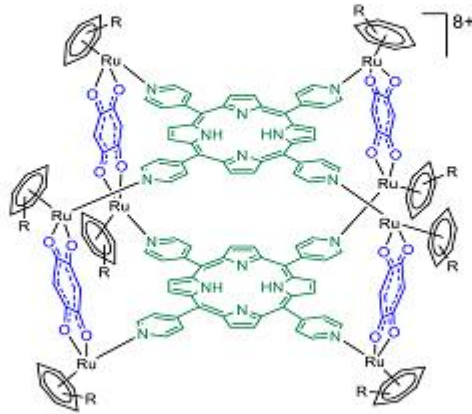


Figure 1: Ruthenium metallacages containing TPyP.

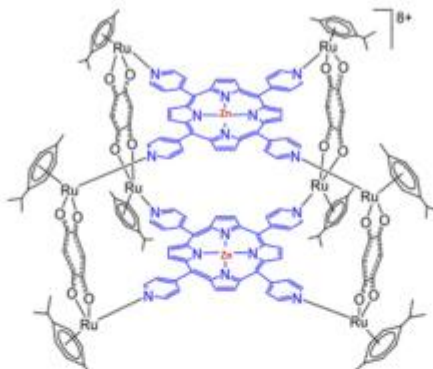


Figure 2: Ruthenium metallacages containing Zn-TPyP.

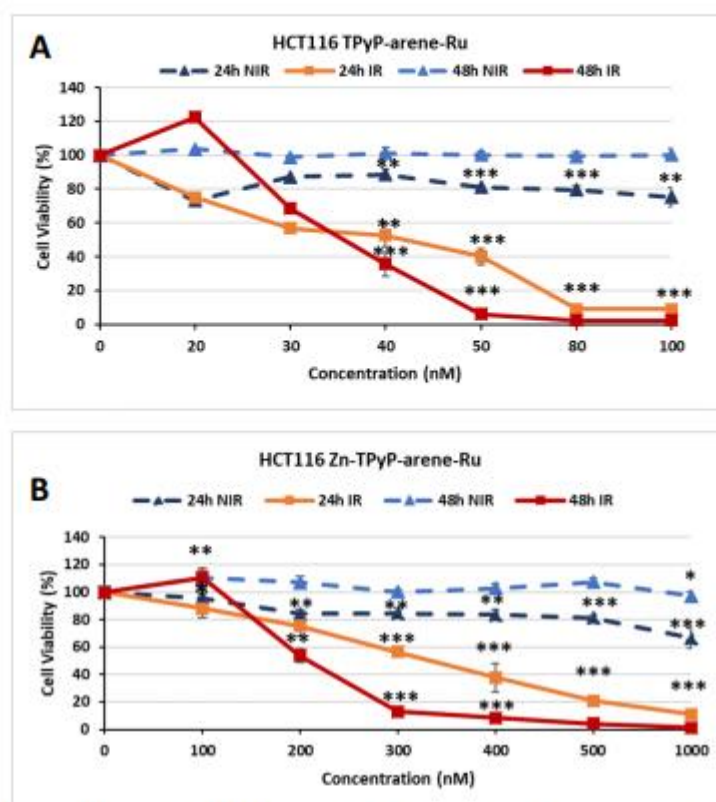


Figure 3: Photocytotoxic effect of TPyP-arene-Ru (A) and Zn-TPyP-arene-Ru (B) on HCT116 cells.

Cells were seeded in 96-well culture plates and grown for 36h in an appropriate culture medium before exposure or not to TPyP or Zn-TPyP-arene-Ru complexes. After 24h incubation, cells were irradiated or not with a 630-660 nm CURElight lamp at 75 J/cm^2 (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). MTT assays were performed 24 and 48h post-irradiation and cell viability was expressed as a percentage of each treatment condition by normalizing to untreated cells. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Table 1: IC₅₀ values determined with MTT assays on HCT116 cells.

PS	IC ₅₀ /PDT 24h	IC ₅₀ /PDT 48h	IC ₅₀ /Obscurity
TPyP-arene-Ru	41.89	35.24	> 100
Zn-TPyP-arene-Ru	331.23	207.45	> 1000

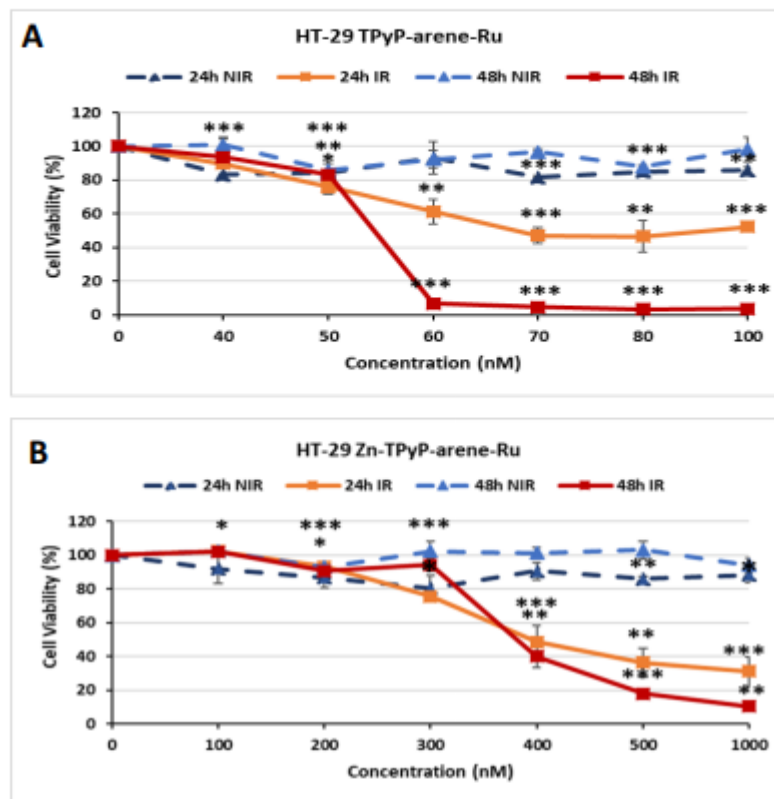


Figure 4: Photocytotoxic effect of TPyP-arene-Ru (A) and Zn-TPyP-arene-Ru (B) on HT-29 cells.

Cells were seeded in 96-well culture plates and grown for 36h in an appropriate culture medium before exposure or not to TPyP or Zn-TPyP-arene-Ru complexes. After 24h incubation, cells were irradiated or not with a 630-660 nm CURElight lamp at 75 J/cm^2 (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). MTT assays were performed 24 and 48h post-irradiation and cell viability was expressed as a percentage of each treatment condition by normalizing to untreated cells. Data are shown as mean \pm SEM ($n = 3$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Table 2: IC_{50} values (nM) determined with MTT assays on HT-29 cells.

PS	$\text{IC}_{50}/\text{PDT}$ 24h	$\text{IC}_{50}/\text{PDT}$ 48h	$\text{IC}_{50}/\text{Obscurity}$
TPyP-arene-Ru	67.82	54.10	> 100
Zn-TPyP-arene-Ru	393.89	379.29	> 1000

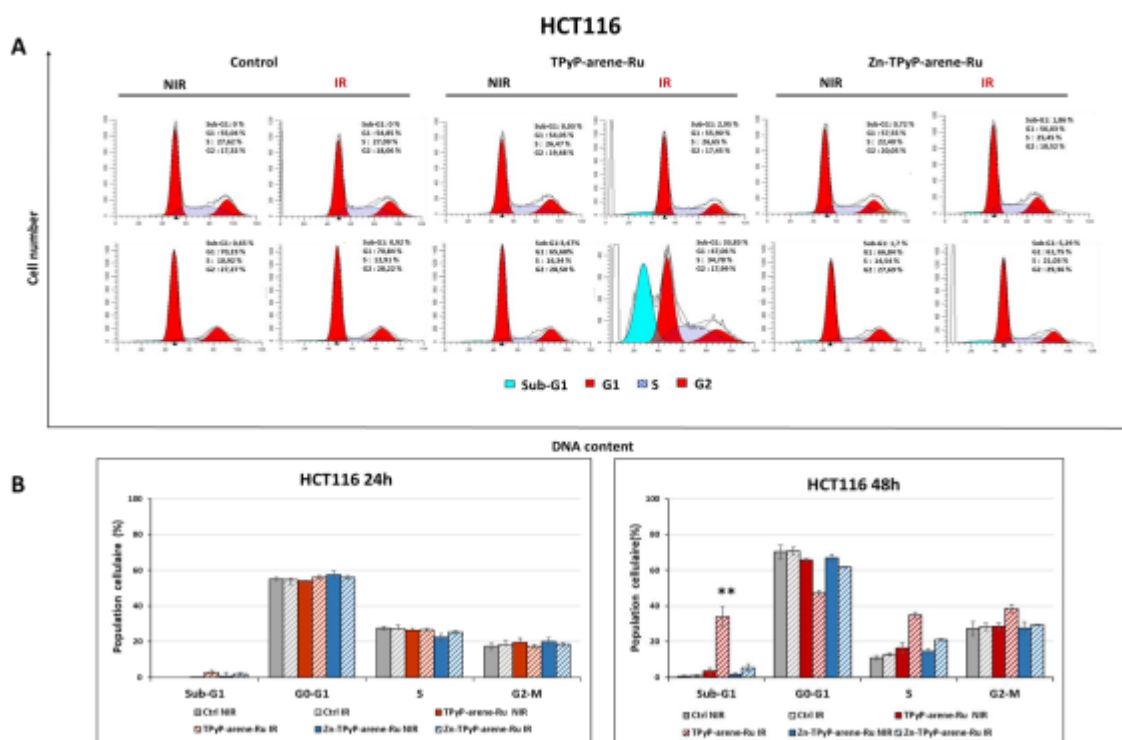


Figure 5: Effects of photoactivation of PS-arene-Ru on the cell cycle distribution in HCT116 cells.

Cells were grown for 36h in an appropriate culture medium before exposure or not to TPyP or Zn-TPyP-arene-Ru complexes. After 24h incubation, cells were irradiated or not with a 630-660 nm CURElight lamp at 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). Then subjected to flow cytometry analysis using PI staining after PDT. Images of cell cycle analysis (A) were representative of three separate experiments. Results of flow cytometry analysis are represented by histograms (B) that display the percentage of cells in each cell cycle phase. Data are shown as mean \pm SEM (n = 3). *** $p < 0.001$

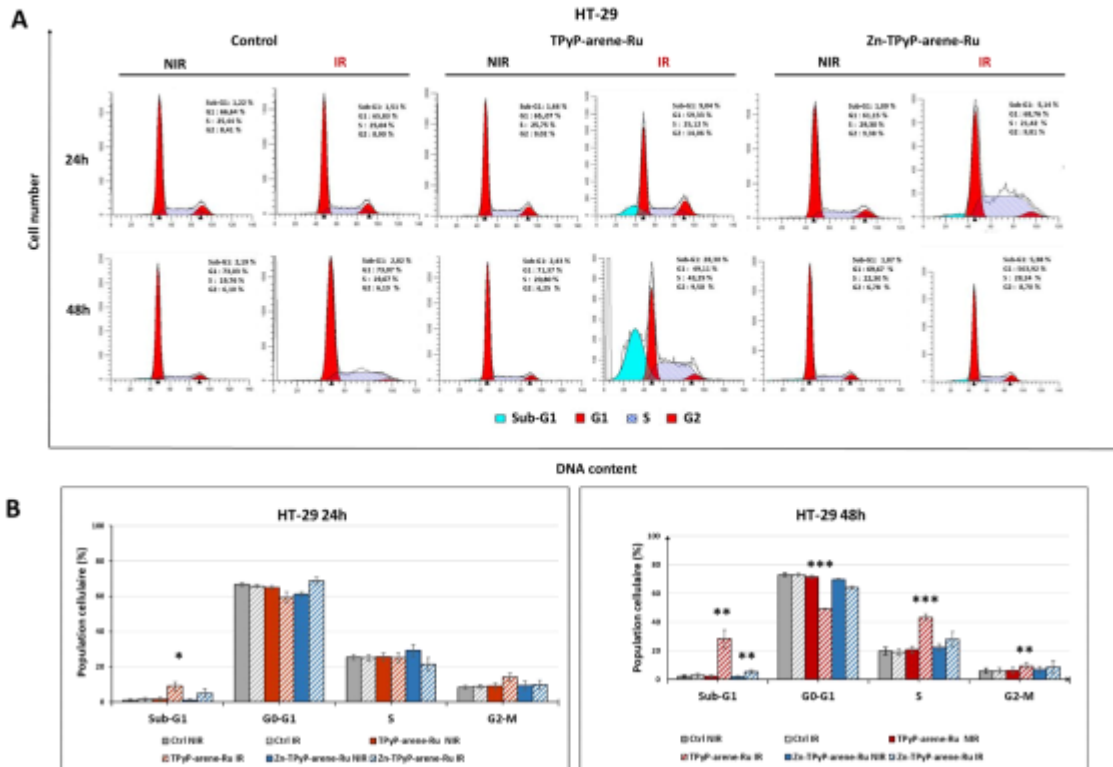


Figure 6: Effects of photoactivation of PS-arene-Ru on the cell cycle distribution in HT-29 cells.

Cells were grown for 36h in an appropriate culture medium before exposure or not to TPyP or Zn-TPyP-arene-Ru complexes. After 24h incubation, cells were irradiated or not with a 630-660 nm CURElight lamp at 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). Then subjected to flow cytometry analysis using Propidium Iodide (PI) staining after PDT. Images of cell cycle analysis (A) shown were representative of three separate experiments. Results of flow cytometry analysis are represented by histograms (B) that display the percentage of cells in each cell cycle phase. Data are shown as mean \pm SEM (n = 3). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

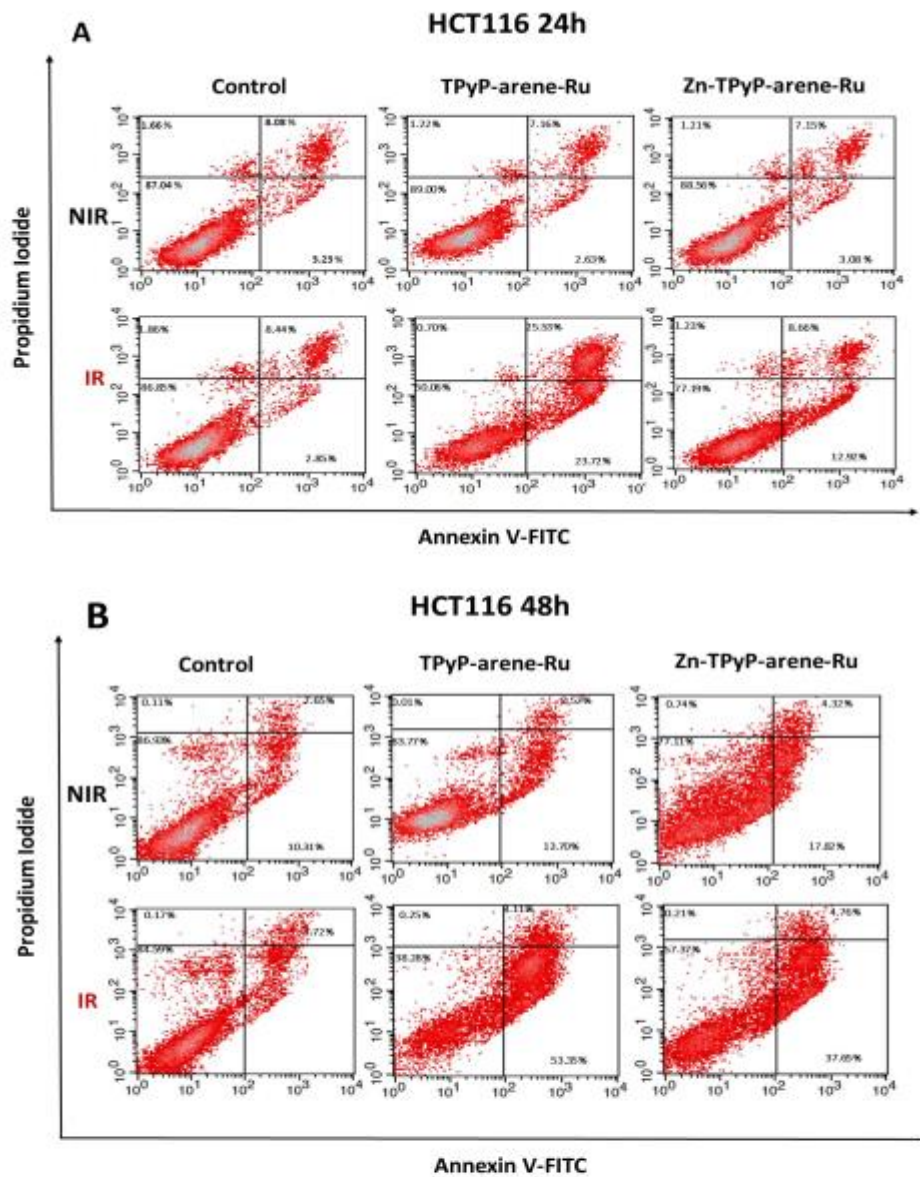


Figure 7: Effects of photoactivation of PS-arene-Ru on HCT116 cell line apoptosis.

Cells were grown for 36h in an appropriate culture medium before exposure or not to TPyP or Zn-TPyP-arene-Ru complexes. After 24h incubation, cells were irradiated or not with a 630-660 nm CURElight lamp at 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). HCT116 cells were also stained, 24h post-PDT (A) and 48h-post-PDT (B) 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. Data are shown as mean ± SEM (n = 3).

16

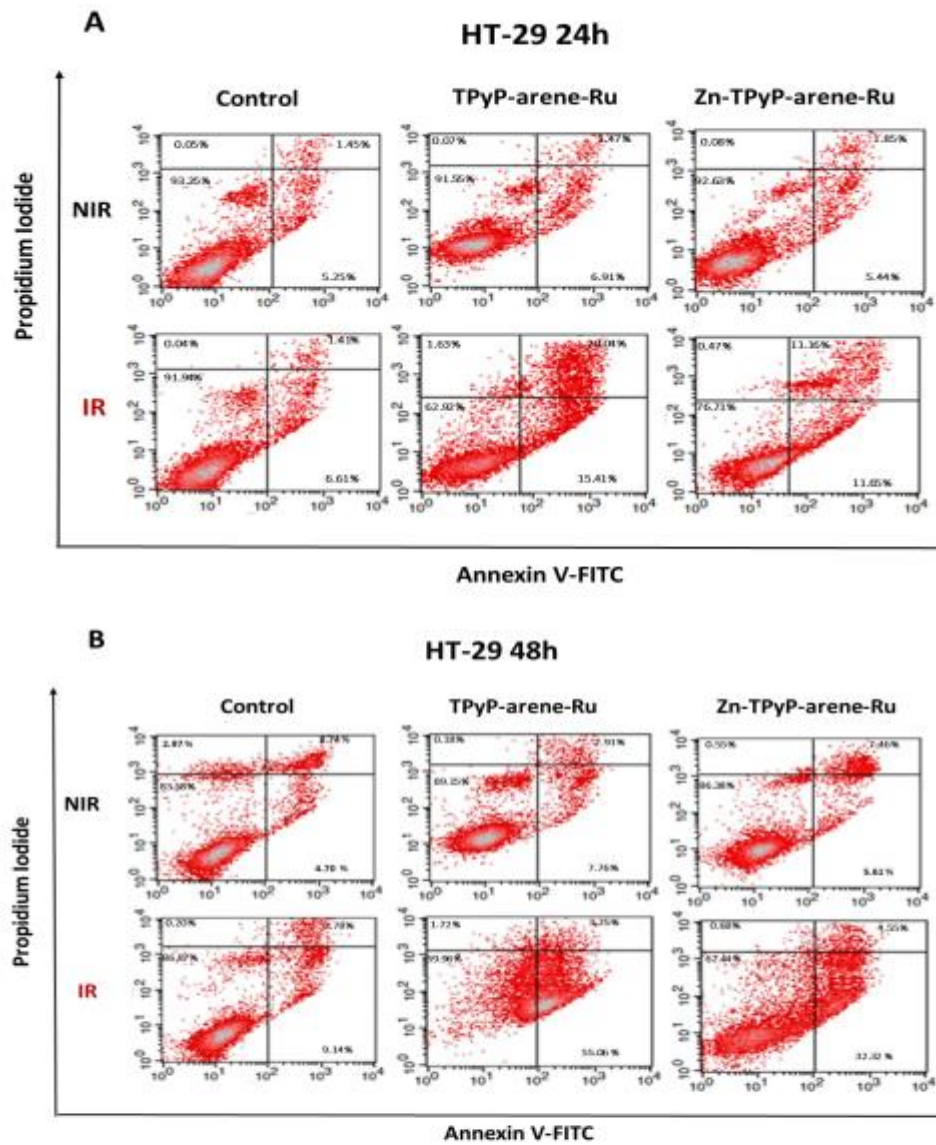


Figure 8: Effects of photoactivation of PS-arene-Ru on HT-29 cell line apoptosis.

Cells were grown for 36h in an appropriate culture medium before exposure or not to TPyP or Zn-TPyP-arene-Ru complexes. After 24h incubation, cells were irradiated or not with a 630-660 nm CURElight lamp at 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). HT-29 cells were also stained, 24h post-PDT (A) and 48h-post-PDT (B) 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. Data are shown as mean \pm SEM (n = 3).

17

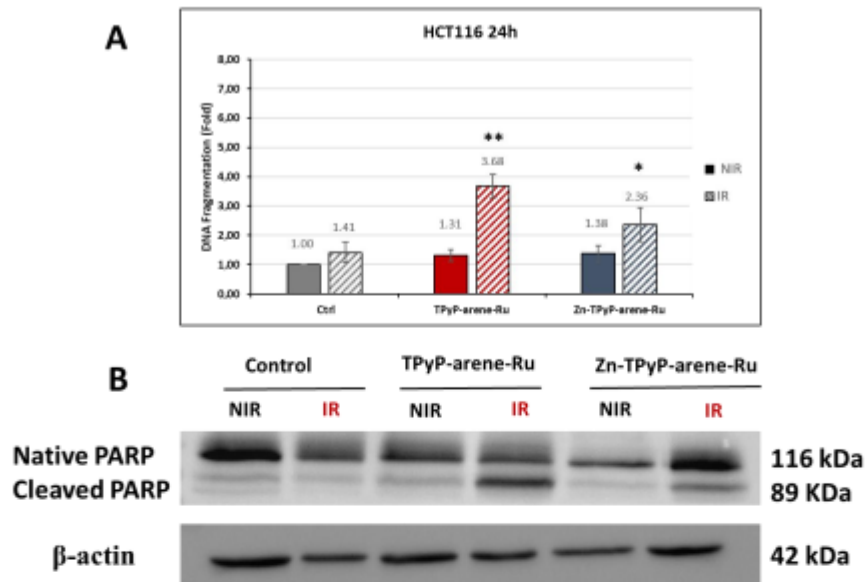


Figure 9: Effects of photoactivation of PS-arene-Ru on apoptosis-related protein expression and DNA fragmentation in colorectal HCT116 cells at 24h.

Cells were grown for 36h in an appropriate culture medium before exposure or not to TPyP or Zn-TPyP-arene-Ru complexes. After 24h incubation, cells were irradiated or not with a 630-660 nm CURElight lamp at 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). (A) Total lysates were harvested and expression of PARP apoptosis-related protein was determined by Western blot analysis. β -actin was used as a loading control. Blots shown are representative of three separate experiments. (B) DNA fragmentation in HCT116 cells 24h post-PDT was quantified from cytosol extracts by ELISA. Results are reported as n-fold compared to control. Data are shown as mean \pm SEM (n= 3). * p < 0.05 ** and p < 0.01.

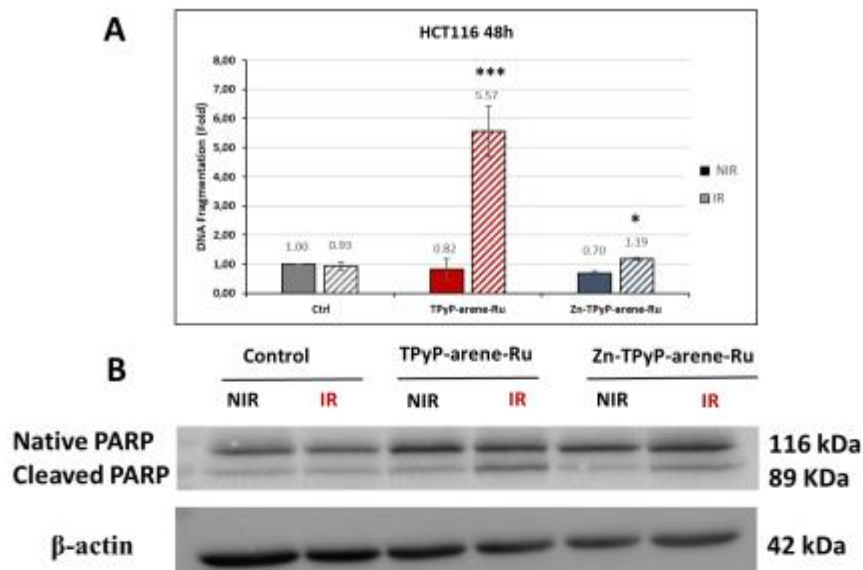


Figure 10: Effects of photoactivation of PS-arene-Ru on apoptosis-related protein expression and DNA fragmentation in colorectal HCT116 cells at 48h.

Cells were grown for 36h in an appropriate culture medium before exposure or not to TPyP or Zn-TPyP-arene-Ru complexes. After 24h incubation, cells were irradiated or not with a 630-660 nm CURElight lamp at 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). (A) Total lysates were harvested and expression of PARP apoptosis-related protein was determined by Western blot analysis. β -actin was used as a loading control. Blots shown are representative of three separate experiments (B) DNA fragmentation in HCT116 cells 48h post-PDT was quantified from cytosol extracts by ELISA. Results are reported as n-fold compared to control Data are shown as mean \pm SEM (n = 3). **p* < 0.05 and *** *p* < 0.001.

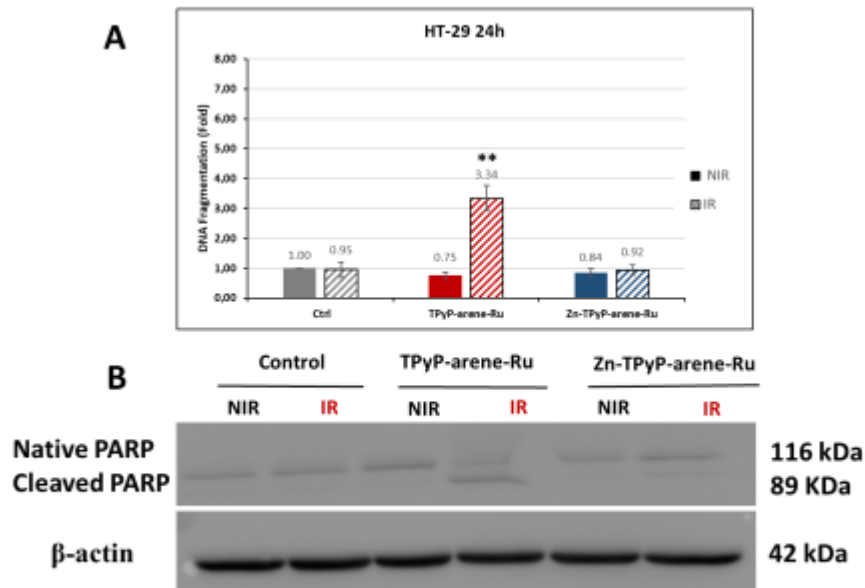


Figure 11: Effects of photoactivation of both compounds on apoptosis-related protein expression and DNA fragmentation in colorectal HT-29 cells at 24h.

Cells were seeded in T-25 culture flasks and grown for 36 h in an appropriate culture medium before exposure or not to TPyP or Zn-TPyP-arene-Ru. After 24 h incubation, cells were irradiated or not with a 630-660 nm CURElight lamp at 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). (A) DNA fragmentation in HT-29 cells 24h post-PDT was quantified from cytosol extracts by ELISA. Results are reported as n-fold compared to control. (B) Total lysates were harvested and expression of PARP apoptosis-related protein was determined by Western blot analysis. β -actin was used as a loading control. Blots shown are representative of three separate experiments. Data are shown as mean \pm SEM (n = 3). ** $p < 0.01$.

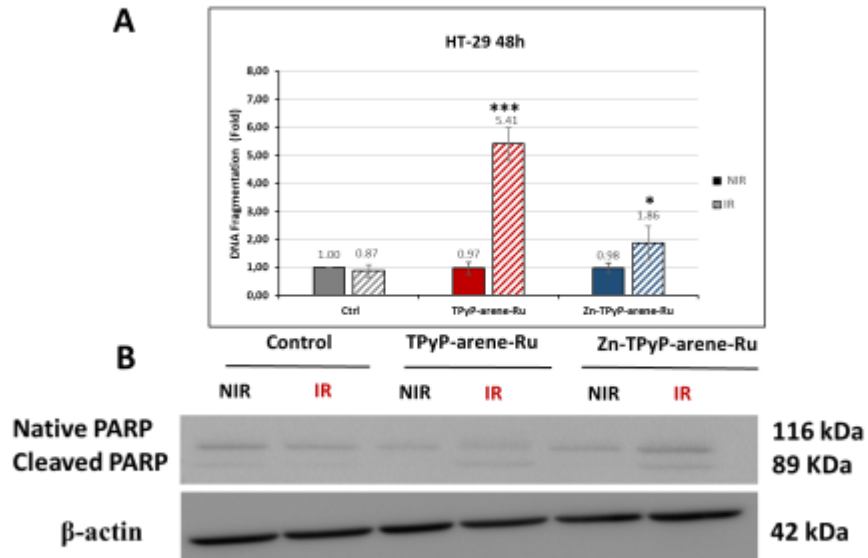


Figure 12 : Effects of photoactivation of both compounds on apoptosis-related protein expression and DNA fragmentation in colorectal HT-29 cells at 48h.

Cells were seeded in T-25 culture flasks and grown for 36 h in an appropriate culture medium before exposure or not to TPyP or Zn-TPyP-arene-Ru. After 24 h incubation, cells were irradiated or not with a 630-660 nm CURElight lamp at 75 J/cm² (PhotoCure ASA, Oslo, Norway). (A) DNA fragmentation in HT-29 cells 48h post-PDT was quantified from cytosol extracts by ELISA. Results are reported as n-fold compared to control. (B) Total lysates were harvested and expression of PARP apoptosis-related protein was determined by Western blot analysis. β -actin was used as a loading control. Blots shown are representative of three separate experiments Data are shown as mean \pm SEM (n=3). * p < 0.05 and *** p < 0.001.

References

- [1] R. Labianca *et al.*, « Colon cancer », *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, vol. 74, n° 2, p. 106-133, mai 2010, doi: 10.1016/j.critrevonc.2010.01.010.
- [2] M. Colonna, « Chapter 1 - Épidémiologie », in *Cancérologie Colorectale*, J.-L. FAUCHERON, Éd. Paris: Elsevier Masson, 2020, p. 1-10. doi: 10.1016/B978-2-294-77454-6.00001-5.
- [3] H. Sung *et al.*, « Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries », *C.A.A Cancer J Clin*, vol. 71, n° 3, p. 209-249, mai 2021, doi: 10.3322/caac.21660.
- [4] C. Hobeika *et J. Lefèvre*, « Chapter 4 - Bilan du cancer colorectal », in *Cancérologie Colorectale*, J.-L. FAUCHERON, Éd. Paris: Elsevier Masson, 2020, p. 31-50. doi: 10.1016/B978-2-294-77454-6.00004-0.
- [5] G. P. Nagaraju, D. Shukla, *et N. K. Vishvakarma*, Éd., *Colon Cancer Diagnosis and Therapy: Volume 1*. Cham: Springer International Publishing, 2021. doi: 10.1007/978-3-030-63369-1.
- [6] H. H. Li-Chang *et al.*, *Atlas of Intestinal Pathology: Volume 1: Neoplastic Diseases of the Intestines*. Cham: Springer International Publishing, 2019. doi: 10.1007/978-3-030-12379-6.
- [7] H. Ishida *et K. Koda*, *Recent advances in the treatment of colorectal cancer*. Singapore: Springer, 2019.
- [8] G. Baatrup, Éd., *Multidisciplinary Treatment of Colorectal Cancer: Staging – Treatment – Pathology – Palliation*. Cham: Springer International Publishing, 2021. doi: 10.1007/978-3-030-58846-5.
- [9] W. A. Messersmith *et D. J. Ahnen*, « Targeting EGFR in Colorectal Cancer », *N Engl J Med*, vol. 359, n° 17, p. 1834-1836, oct. 2008, doi: 10.1056/NEJMe0806778.
- [10] Z. Kozovska, V. Gabrisova, *et L. Kucerova*, « Colon cancer: cancer stem cells markers, drug resistance and treatment », *Biomed Pharmacother*, vol. 68, n° 8, p. 911-916, oct. 2014, doi: 10.1016/j.biopha.2014.10.019.
- [11] H. Sharifkazemi, S. M. Amini, R. Koochi Ortakand, *et B. Narouie*, « A Review of Photodynamic Therapy in Different Types of Tumors », *Trans.Res.Urol*, vol. 4, n° 2, avr. 2022, doi: 10.22034/tru.2022.337411.1108.
- [12] P. Agostinis *et al.*, « Photodynamic therapy of cancer: An update », *C.A. A Cancer Journal for Clinicians*, vol. 61, n° 4, p. 250-281, juill. 2011, doi: 10.3322/caac.20114.
- [13] U. Chilakamarthi *et L. Giribabu*, « Photodynamic Therapy: Past, Present and Future », *Chem. Rec.*, vol. 17, n° 8, p. 775-802, août 2017, doi: 10.1002/tcr.201600121.
- [14] L. Bretin *et al.*, « Photodynamic Therapy Activity of New Porphyrin-Xylan-Coated Silica Nanoparticles in Human Colorectal Cancer », *Cancers*, vol. 11, n° 10, p. 1474, sept. 2019, doi: 10.3390/cancers11101474.
- [15] N. Hodgkinson, C. A. Kruger, *et H. Abrahamse*, « Targeted photodynamic therapy as potential treatment modality for the eradication of colon cancer and colon cancer stem cells », *Tumour Biol.*, vol. 39, n° 10, p. 101042831773469, oct. 2017, doi: 10.1177/1010428317734691.
- [16] A. P. Castano, P. Mroz, *et M. R. Hamblin*, « Photodynamic therapy and anti-tumour immunity », *Nat Rev Cancer*, vol. 6, n° 7, p. 535-545, juill. 2006, doi: 10.1038/nrc1894.
- [17] A. F. Dos Santos, D. R. Q. De Almeida, L. F. Terra, M. S. Baptista, *et L. Labriola*, « Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review », *JCMT*, vol. 2019, mars 2019, doi: 10.20517/2394-4722.2018.83.
- [18] F. P. Sellera, C. L. Nascimento, *et M. S. Ribeiro*, Éd., *Photodynamic Therapy in Veterinary Medicine: From Basics to Clinical Practice*. Cham: Springer International Publishing, 2016. doi: 10.1007/978-3-319-45007-0.

- [19] M. S. Baptista *et al.*, « Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways », *Photochem Photobiol*, vol. 93, n° 4, p. 912-919, juill. 2017, doi: 10.1111/php.12716.
- [20] S. Kwiatkowski *et al.*, « Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations », *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 106, p. 1098-1107, oct. 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.
- [21] *Photophysique et photochimie: des fondements aux applications*. Les Ulis: EDP sciences, 2016.
- [22] A. Nowak-Stepniowska, P. Pergoń, et A. Padzik-Graczyk, « [Photodynamic method of cancer diagnosis and therapy--mechanisms and applications] », *Postępy Biochem*, vol. 59, n° 1, p. 53-63, 2013.
- [23] Z. Luksiene, « Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment », *Medicina (Kaunas)*, vol. 39, n° 12, p. 1137-1150, 2003.
- [24] A. Juzeniene et J. Moan, « The history of PDT in Norway », *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 4, n° 1, p. 3-11, mars 2007, doi: 10.1016/j.pdpdt.2006.11.002.
- [25] S. M. Fonseca *et al.*, « Triplet-State and Singlet Oxygen Formation in Fluorene-Based Alternating Copolymers », *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, n° 16, p. 8278-8283, avr. 2006, doi: 10.1021/jp060251f.
- [26] D. Kessel, « Death pathways associated with photodynamic therapy », *Medical Laser Application*, vol. 21, n° 4, p. 219-224, nov. 2006, doi: 10.1016/j.mla.2006.05.006.
- [27] W. Zhu *et al.*, « Comparison between porphyrin, chlorin and bacteriochlorin derivatives for photodynamic therapy: Synthesis, photophysical properties, and biological activity », *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 160, p. 146-156, déc. 2018, doi: 10.1016/j.ejmech.2018.10.005.
- [28] T. Lazarević, A. Rilak, et Ž. D. Bugarčić, « Platinum, palladium, gold and ruthenium complexes as anticancer agents: Current clinical uses, cytotoxicity studies and future perspectives », *Eur J Med Chem*, vol. 142, p. 8-31, déc. 2017, doi: 10.1016/j.ejmech.2017.04.007.
- [29] E. Alessio, G. Mestroni, A. Bergamo, et G. Sava, « Ruthenium Antimetastatic Agents », *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 4, n° 15, p. 1525-1535, nov. 2004, doi: 10.2174/1568026043387421.
- [30] Ž. D. Bugarčić, J. Bogojeski, B. Petrović, S. Hochreuther, et R. van Eldik, « Mechanistic studies on the reactions of platinum(II) complexes with nitrogen- and sulfur-donor biomolecules », *Dalton Trans.*, vol. 41, n° 40, p. 12329, 2012, doi: 10.1039/c2dt31045g.
- [31] T. Gianferrara *et al.*, « Ruthenium–Porphyrin Conjugates with Cytotoxic and Phototoxic Antitumor Activity », *J. Med. Chem.*, vol. 53, n° 12, p. 4678-4690, juin 2010, doi: 10.1021/jm1002588.
- [32] I. Kostova, « Ruthenium complexes as anticancer agents », *Curr Med Chem*, vol. 13, n° 9, p. 1085-1107, 2006, doi: 10.2174/092986706776360941.
- [33] J. Mosquera, M. I. Sánchez, M. E. Vázquez, et J. L. Mascareñas, « Ruthenium bipyridyl complexes as photocleavable dimerizers: deactivation of DNA-binding peptides using visible light », *Chem. Commun.*, vol. 50, n° 75, p. 10975-10978, 2014, doi: 10.1039/C4CC04512B.
- [34] M. Pernot, R. Vanderesse, C. Frochot, F. Guillemin, et M. Barberi-Heyob, « Stability of peptides and therapeutic success in cancer », *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, vol. 7, n° 7, p. 793-802, juill. 2011, doi: 10.1517/17425255.2011.574126.
- [35] B. Therrien et J. Furrer, « The Biological Side of Water-Soluble Arene Ruthenium Assemblies », *Advances in Chemistry*, vol. 2014, p. 589686, juill. 2014, doi: 10.1155/2014/589686.
- [36] A. Gabrielsson, J. R. Lindsay Smith, et R. N. Perutz, « Remote site photosubstitution in metalloporphyrin-ruthenium tricarbonylbipyridine assemblies: photo-reactions of molecules with very short lived excited states », *Dalton Trans.*, n° 32, p. 4259-4269, août 2008, doi: 10.1039/b806267f.

- [37] M. Gallardo-Villagrán *et al.*, « Evaluation of Ruthenium-Based Assemblies as Carriers of Photosensitizers to Treat Rheumatoid Arthritis by Photodynamic Therapy », *Pharmaceutics*, vol. 13, n° 12, p. 2104, déc. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13122104.
- [38] M. Gallardo-Villagrán *et al.*, « Ruthenium-based assemblies incorporating tetrapyrrolylporphyrin panels: A photosensitizers delivery strategy for the treatment of rheumatoid arthritis by photodynamic therapy », *Dalton Transactions*, vol. 51, mai 2022, doi: 10.1039/D2DT00917J.
- [39] M. Gallardo-Villagrán, L. Paulus, Y. Champavier, D. Y. Leger, B. Therrien, et B. Liagre, « Combination of tetrapyrrolylporphyrins and arene ruthenium(II) complexes to treat synovial sarcoma by photodynamic therapy », *J. Porphyrins Phthalocyanines*, p. A-I, déc. 2021, doi: 10.1142/S1088424622500018.
- [40] M. Gallardo-Villagrán, L. Paulus, Y. Champavier, D. Y. Leger, B. Therrien, et B. Liagre, « Combination of tetrapyrrolylporphyrins and arene ruthenium(II) complexes to treat synovial sarcoma by photodynamic therapy », *J. Porphyrins Phthalocyanines*, vol. 26, n° 08, p. 533-541, août 2022, doi: 10.1142/S1088424622500018.
- [41] F. Schmitt *et al.*, « Ruthenium porphyrin compounds for photodynamic therapy of cancer », *J Med Chem*, vol. 51, n° 6, p. 1811-1816, mars 2008, doi: 10.1021/jm701382p.
- [42] J. Čubrilo, I. Hartenbach, T. Schleid, et R. F. Winter, « Tethering versus Non-Coordination of Hydroxy and Methoxy Side Chains in Arene Half Sandwich Dichloro Ruthenium Complexes », *Z. anorg. allg. Chem.*, vol. 632, n° 3, p. 400-408, févr. 2006, doi: 10.1002/zaac.200500385.
- [43] C. Lepage, D. Y. Léger, J. Bertrand, F. Martin, J. L. Beneytout, et B. Liagre, « Diosgenin induces death receptor-5 through activation of p38 pathway and promotes TRAIL-induced apoptosis in colon cancer cells », *Cancer Letters*, vol. 301, n° 2, p. 193-202, févr. 2011, doi: 10.1016/j.canlet.2010.12.003.
- [44] B. Rioux *et al.*, « Synthesis and biological evaluation of chalcone-polyamine conjugates as novel vectorized agents in colorectal and prostate cancer chemotherapy », *European Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 222, p. 113586, oct. 2021, doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113586.
- [45] R. Wai-Yin Sun, M. Zhang, D. Li, M. Li, A. Sze-Tsai Wong, « Enhanced anti-cancer activities of a gold(III) pyrrolidinedithiocarbamate complex incorporated in a biodegradable metal-organic framework », *Journal of Inorganic Biochemistry*, vol. 163, p. 1-7, oct. 2016, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.06.020.
- [46] S. Y. Lee, C. Y. Kim, et T.-G. Nam, « Ruthenium Complexes as Anticancer Agents: A Brief History and Perspectives », *DDDT*, vol. Volume 14, p. 5375-5392, déc. 2020, doi: 10.2147/DDDT.S275007.
- [47] F. Schmitt, P. Govindaswamy, O. Zava, G. Süß-Fink, L. Juillerat-Jeamneret, et B. Therrien, « Combined arene ruthenium porphyrins as chemotherapeutics and photosensitizers for cancer therapy », *J Biol Inorg Chem*, vol. 14, n° 1, p. 101-109, janv. 2009, doi: 10.1007/s00775-008-0427-y.
- [48] G. Süß-Fink, « Areneruthenium complexes as anticancer agents », *Dalton Trans.*, vol. 39, n° 7, p. 1673-1688, 2010, doi: 10.1039/B916860P.
- [49] C. G. Hartinger et P. J. Dyson, « Bioorganometallic chemistry—from teaching paradigms to medicinal applications », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, n° 2, p. 391-401, janv. 2009, doi: 10.1039/B707077M.
- [50] M. Gaschard, F. Nehzat, T. Cheminel, et B. Therrien, « Arene Ruthenium Metalla-Assemblies with Anthracene Moieties for PDT Applications », *Inorganics*, vol. 6, n° 3, p. 97, sept. 2018, doi: 10.3390/inorganics6030097.
- [51] V. Bogoeva *et al.*, « Ruthenium porphyrin-induced photodamage in bladder cancer cells », *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 14, p. 9-17, juin 2016, doi: 10.1016/j.pdpdt.2016.01.012.

- [52] S. Rani-Beeram, K. Meyer, A. McCrate, Y. Hong, M. Nielsen, et S. Swavey, « A Fluorinated Ruthenium Porphyrin as a Potential Photodynamic Therapy Agent: Synthesis, Characterization, DNA Binding, and Melanoma Cell Studies », *Inorg. Chem.*, vol. 47, n° 23, p. 11278-11283, déc. 2008, doi: 10.1021/ic8015589.
- [53] M. Gallardo-Villagrán, L. Paulus, Y. Champavier, D. Leger, B. Therrien, et B. Liagre, « Combination of tetrapyrrolylporphyrins and arene ruthenium (II) complexes to treat synovial sarcoma by photodynamic therapy », *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, nov. 2021, doi: 10.1142/S1088424622500018.
- [54] P. Zhao *et al.*, « DNA binding and photocleavage properties of a novel cationic porphyrin-anthraquinone hybrid », *Biophysical Chemistry*, vol. 134, n° 1, p. 72-83, avr. 2008, doi: 10.1016/j.bpc.2008.01.009.
- [55] R. Kim, « Recent advances in understanding the cell death pathways activated by anticancer therapy », *Cancer*, vol. 103, n° 8, p. 1551-1560, avr. 2005, doi: 10.1002/cncr.20947.
- [56] S. L. R. Silva *et al.*, « Ru(II)-thymine complex causes DNA damage and apoptotic cell death in human colon carcinoma HCT116 cells mediated by JNK/p38/ERK1/2 via a p53-independent signaling », *Scientific Reports*, vol. 9, n° 1, p. 11094, juill. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-47539-0.
- [57] A. K. Mishra et L. Mishra, Éd., *Ruthenium chemistry*. Singapore: Pan Stanford Publishing, 2018.
- [58] Y. Lu, T. Shen, H. Yang, et W. Gu, « Ruthenium Complexes Induce HepG2 Human Hepatocellular Carcinoma Cell Apoptosis and Inhibit Cell Migration and Invasion through Regulation of the Nrf2 Pathway », *Int J Mol Sci*, vol. 17, n° 5, p. E775, mai 2016, doi: 10.3390/ijms17050775.

Effets antiprolifératifs de photosensibilisateurs fonctionnalisés avec des complexes arène-ruthénium pour la thérapie photodynamique du cancer colorectal

Le cancer colorectal (CCR) est classé comme la troisième principale cause de tumeur fréquemment diagnostiquée dans le monde. Malgré tous les progrès thérapeutiques, il demeure la deuxième cause de décès par cancer en 2022. Les effets secondaires des traitements conventionnels, l'apparition de résistances, la récurrence des tumeurs et l'importance accordée à la qualité de vie des patients mettent en évidence la nécessité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques anticancéreuses. La thérapie photodynamique (PDT) mettant en œuvre l'utilisation de photosensibilisateurs (PS) se révèle être une stratégie thérapeutique innovante qui permet de limiter considérablement les inconvénients des thérapies conventionnelles. En revanche, la faible solubilité, l'instabilité et la mauvaise sélectivité vis-à-vis des tumeurs des PS sont les principales limitations de cette thérapie. La porphyrine est un des principaux PS utilisé dans cette innovation thérapeutique. Néanmoins, pour contourner les limites de son utilisation dans cette étude, la tétrapyridylporphine (TPyP) a été fonctionnalisée dans des cages métalliques de forme cubique à base d'arène ruthénium (II) (TPyP-arène-Ru). Ces assemblages métalliques avec leurs propriétés intéressantes se présentent comme un système innovant de vectorisation de PS. L'objectif de ce projet a été d'évaluer *in vitro* l'effet anticancéreux de la TPyP-arène-Ru photoactivée par la lumière rouge en la comparant avec son analogue la Zn-TPyP-arène-Ru sur deux lignées du CCR, puis de déterminer le processus de mort cellulaire engendré par ces deux complexes. Nous avons démontré que les deux complexes possédaient un effet phototoxique très intéressant. La TPyP-arène-Ru s'est avérée plus cytotoxique que son analogue. De même, nous avons montré que la mort cellulaire induite après photoactivation de la TPyP-arène-Ru et de la Zn-TPyP-arène-Ru dépendait de la voie apoptotique. Cette étude a permis par la suite de présenter les assemblages cubiques à base d'arène ruthénium comme des systèmes prometteurs de vectorisation de la TPyP pour de futures études thérapeutiques contre le CCR.

Mots-clés : Cancer colorectal, thérapie photodynamique, assemblages métalliques, arène ruthénium, porphyrine, apoptose.

Antiproliferative effects of photosensitizers functionalized with arene-ruthenium complexes for photodynamic therapy of colorectal cancer

Colorectal cancer (CRC) is ranked as the third most frequently diagnosed cancer in the world. Despite all the therapeutic advances, it remains the second leading cause of cancer deaths in 2022. The side effects of conventional treatments, the appearance of resistance, tumor recidivism, and the importance of focusing on patients' life quality highlight the need to develop new anti-cancer therapeutic strategies. Photodynamic therapy (PDT) using photosensitizers (PS) is proving to be an innovative and adjuvant therapeutic strategy that considerably limits the disadvantages of conventional therapies. On the other hand, the PS's low solubility, instability, and poor selectivity towards tumors are the main limitations of this therapy. Porphyrin is one of the main PS used in this therapeutic innovation. Nevertheless, to overcome the limitations of its use in this study, tetrapyrindylporphine (TPyP) was functionalized with arene-ruthenium (II) cubic metal cages (TPyP-arene-Ru). These metal assemblies with their interesting properties present themselves as an innovative PS delivery system. The objective of this project was to evaluate *in vitro* the anticancer effect of TPyP-arene-Ru photoactivated by red light, to compare it with its analog Zn-TPyP-arene-Ru on two CRC lines, and then to determine the cell death process generated by these two complexes. We demonstrated that both complexes possessed a very interesting phototoxic effect. TPyP-arene-Ru was found to be more cytotoxic than its analog. Similarly, it was shown that the cell death induced by photoactivation of TPyP-arene-Ru and Zn-TPyP-arene-Ru is dependent on the apoptotic pathway. This study subsequently introduced arene-ruthenium cubic assemblies as promising PS delivery systems of TPyP for future therapeutic studies against CRC.

Keywords: Colorectal cancer, photodynamic therapy, metal assemblies, arene-ruthenium, porphyrin, apoptosis.

